

Titre: Dégradation et réparation du cartilage articulaire : études des composantes mécaniques dans la dégradation de la matrice et des mécanismes de migration des cellules souches mésenchymateuses dans le contexte du génie tissulaire

Auteur: Marc Thibault
Author:

Date: 2006

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Thibault, M. (2006). Dégradation et réparation du cartilage articulaire : études des composantes mécaniques dans la dégradation de la matrice et des mécanismes de migration des cellules souches mésenchymateuses dans le contexte du génie tissulaire [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7793/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7793/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche:
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉGRADATION ET RÉPARATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE: ÉTUDES
DES COMPOSANTES MÉCANIQUES DANS LA DÉGRADATION DE LA
MATRICE ET DES MÉCANISMES DE MIGRATION DES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES DANS LE CONTEXTE DU GÉNIE TISSULAIRE

MARC THIBAUT

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

NOVEMBRE 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-24550-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-24550-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

DÉGRADATION ET RÉPARATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE: ÉTUDES
DES COMPOSANTES MÉCANIQUES DANS LA DÉGRADATION DE LA
MATRICE ET DES MÉCANISMES DE MIGRATION DES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES DANS LE CONTEXTE DU GÉNIE TISSULAIRE.

présentée par : THIBAUT Marc

en vue de l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph.D., présidente

M. BUSCHMANN Michael D., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre

Mme FERNANDES Maria, Ph.D., membre

DÉDICACE

À ma famille, Louise, André et Vincent

REMERCIEMENTS

Avant tout je tiens à remercier mon directeur de recherche Michael Buschmann pour ses conseils judicieux et ses encouragements. Merci Mike de m'avoir donné l'occasion de poursuivre mes travaux dans un milieu aussi stimulant par la qualité de ses infrastructures de pointe. Stimulants plus encore tous ces gens aux côtés de qui j'ai travaillé : Nick et Marc, aussi Steph, Anne, Julie, Jun, Josée, Geneviève, Catherine et bien sûr, Caro. C'est grâce à vous que mes années à l'École ont été aussi intéressantes. Pour le biologiste de formation que je suis, la possibilité de côtoyer des physiciens et des ingénieurs a été très enrichissante. En somme, j'ai toujours apprécié l'esprit de camaraderie et la diversité des compétences qui règnent dans le groupe, à l'image de celui qui l'a bâti.

Je remercie aussi mon père André Thibault, qui m'a fortement encouragé à entreprendre ce défi, devant lequel j'étais hésitant au départ, et qui par la suite m'a encouragé de plusieurs façons à continuer jusqu'au bout. Merci à ma mère Louise Banville, sans elle, Dieu seul sait où j'en serais! Merci à ma tante Marie Thibault, pour le peaufinage des textes.

Quand on me demande si je recommencerais cette aventure, je réponds «Oui». La raison s'appelle Tania. Car c'est à l'École que je l'ai rencontrée et c'est bien la chose la plus formidable que Poly m'ait apportée. Merci Tania pour ta patience au cours de ces derniers mois, pour ton aide et surtout pour n'avoir jamais douté.

Pour terminer, je remercie les organismes qui m'ont soutenu, le Fonds canadien d'excellence de l'arthrite, la compagnie Biosyntech et tout particulièrement l'École Polytechnique qui m'a permis d'apprendre mon métier de chercheur dans un établissement de tout premier ordre.

RÉSUMÉ

Les désordres articulaires sont la cause la plus importante de souffrances quotidiennes et d'invalidité chez les plus de 50 ans. L'ostéoarthrite (OA) est une pathologie articulaire associée à des douleurs persistantes; elle se manifeste par l'affaiblissement et éventuellement l'immobilisation et la perte de fonction des jointures. Elle se caractérise par une dégradation sévère du cartilage articulaire, tissu recouvrant les os à leurs extrémités, et par un niveau d'inflammation assez faible relativement à l'arthrite rhumatoïde. Malgré l'importance des impacts socio-économiques de cette pathologie, la cascade d'événements menant à cet état (l'éthiopathogénèse) est encore mal connue. Les techniques de diagnostic sont peu précoces, les thérapies sont généralement palliatives et très invasives, le cartilage étant déjà gravement - irréversiblement - dégradé lorsque les symptômes apparaissent. Les besoins criants de meilleurs traitements à des stades précoces et une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à cette détérioration articulaire expliquent la motivation qui gouverne ce projet de recherche.

Le cartilage articulaire est principalement composé d'eau et de deux protéines, soit le collagène, molécule fibrillaire limitant le gonflement du tissu induit par l'électronégativité des autres composés, les protéoglycanes. Le collagène assure une surface congruente et sans friction entre les deux extrémités osseuses en contact en plus de transmettre et de distribuer les forces générées par les mouvements aux os, lesquels sont mieux adaptés que le cartilage pour ce qui est d'absorber les contraintes. Plusieurs études tendent à démontrer que les facteurs mécaniques peuvent avoir un rôle important dans la dégradation du tissu. Les études précédentes concernant l'analyse biochimique du cartilage dégradé mécaniquement s'étant surtout concentrées sur le contenu en eau, le gonflement, la synthèse et la perte de protéoglycanes et/ou sur l'analyse histologique du cartilage et de l'os, aucune étude n'a encore fourni des données sur la possibilité d'une dégradation directe du collagène due à des chargements.

La première étude de cette thèse a pour objectif de déterminer si le collagène peut être détruit ou dénaturé par les chargements mécaniques et d'élucider le processus par lequel cette molécule est affectée. Les compressions non-confinées induisent une extension latérale du tissu qui adopte, sous des compressions rapides, un comportement principalement élastique plutôt que viscoélastique (pas d'écoulement de fluide). La résistance aux compressions est alors assurée principalement par la matrice extracellulaire qui impose de fortes contraintes au collagène. L'hypothèse de départ stipule que les stimulations mécaniques en compressions uniaxiales non-confinées peuvent dénaturer la molécule de collagène. La stratégie utilisée dans cet article combine la culture *in vitro* d'explants cartilagineux qui sont compressés à haute amplitude et testés mécaniquement par un système de microtestage avec des analyses biochimiques par des tests spécifiques et novateurs. Les résultats ont démontré clairement pour la première fois que l'application de contraintes sur le cartilage peut entraîner directement, sans processus enzymatique, un changement de conformation, une dénaturation de la molécule de collagène. De concert avec les données montrant une disparition des molécules dégradées avec le temps en culture, ces résultats coïncident avec plusieurs, démontrant un rôle des facteurs mécaniques dans l'entretien de la matrice et le métabolisme cellulaire, et pourraient avoir une importance dans la compréhension des mécanismes pathologiques de l'ostéoarthrite menant à la dégradation non-inflammatoire du cartilage articulaire.

Le cartilage a une capacité de réparation limitée; les lésions de ce tissu entraînent souvent avec les années une dégradation généralisée. Les autres travaux qui complètent cette thèse concernent aussi le cartilage, mais ils se concentrent sur la régénération du cartilage; ils s'inscrivent dans le cadre du génie tissulaire du cartilage, domaine où l'on tente de développer des thérapies impliquant des cellules et/ou des biomatériaux susceptibles de promouvoir la régénération complète du tissu. Le phénomène ciblé par les deux études suivantes est la migration cellulaire, plus particulièrement celle des cellules souches mésenchymateuses de la moelle (CSM). Ces cellules, déjà considérées

comme essentielles dans les processus naturels de réparation des cartilages et des os, possèdent des caractéristiques qui font d'elles d'excellentes candidates au développement de stratégies en génie tissulaire, où l'on tente d'harnacher leur potentiel par recrutement *in situ* ou par transplantation autologue. Toutes ces stratégies impliquent un phénomène cellulaire complexe, la migration cellulaire, et nécessitent une bonne compréhension de ce processus.

La deuxième étude publiée en novembre 2006 dans *Cell Motility and the Cytoskeleton* a pour objectif de développer une technique qui permettrait une visualisation en trois dimensions claire et détaillée du phénomène de migration des CSM. La plupart des études mécanistiques de la migration cellulaire sont en deux dimensions, et font rarement appel aux CSM. J'ai posé l'hypothèse initiale que l'utilisation d'une méthode *in vitro*, spécifique à l'étude quantitative de la migration d'une population cellulaire, l'essai transmembranaire ou la chambre Boyden modifiée, pourrait être adaptée afin de pouvoir observer par microscopie confocale les cellules individuelles en mouvement dans l'axe z. Cette nouvelle technique nous a permis d'observer simultanément dans une même cellule les éléments principaux du cytosquelette d'une CSM migrant dans un environnement tridimensionnel, une première dans le domaine. Les images spectaculaires qui ont été ainsi obtenues - la revue songe à les utiliser pour la page couverture de son numéro de novembre - ont permis d'identifier des mécanismes cellulaires de migration différents de ceux qu'on avait observés en deux dimensions. Elles démontrent que cette méthode est idéale pour comparer les données en deux dimensions existantes aux mécanismes tridimensionnels, qui se rapprochent des mécanismes *in vivo*. En plus, nous estimons que cette méthode permettra de faire la lumière sur des mécanismes encore peu connus de la migration 3D, comme la translocation nucléaire et la maturation des adhésions, faute de technique alliant à la fois environnement 3D et qualité des images.

Finalement, la troisième et dernière étude, un article soumis à la revue *Stem Cells and Development*, a pour objectif de déterminer les effets des protéines de la matrice

extracellulaire, fibronectine, vitronectine et collagène 1, sur le comportement mobile des CSM. Les CSM du lapin et de l'humain ont été testées parallèlement afin de vérifier si l'extrapolation des études sur le lapin, animal largement utilisé comme modèle dans les techniques de génie tissulaire, peuvent être extrapolées d'une espèce à l'autre quand il s'agit de la migration des CSM. En plus, les tests de migration ont été effectués avec une méthode standardisée et optimisée, ce qui est rare dans ce type d'étude. Les résultats de cette étude démontrent que les CSM des deux espèces se comportent de façon similaire et que les protéines mentionnées ci-dessus induisent une migration dirigée de ces cellules, par deux mécanismes, soit le chimiotactisme et l'haptotaxisme. Nous croyons que ces résultats permettront de mieux comprendre la distribution de ces cellules dans l'organisme, et surtout d'optimiser le design de plates-formes cellulaires et de biomatériaux biomimétiques, de façon à contrôler la distribution des CSM aux sites de lésions, afin d'améliorer la performance des stratégies de médecine régénérative du cartilage et autres tissus musculosquelettiques.

ABSTRACT

Articular disorders are a leading cause of suffering and disability in the population over 50. Osteoarthritis (OA) is an articular pathology associated with persistent pain leading eventually to weakened and immobilized joints. OA is characterized by severe degradation of articular cartilage, covering the extremities of long bones, and by a relatively low level of inflammation compared to rheumatoid arthritis. Despite the important socio-economical consequences of OA, its pathogenesis is still misunderstood. Combined with the fact that symptoms usually appear when cartilage degradation is generalized and irreversible, early diagnostics are difficult and clinical therapies are very invasive and only palliative. The need for early diagnostic technologies and for adapted treatment governs the motivation behind the work of this thesis.

Articular cartilage is mainly composed of water and two proteins, collagen and proteoglycan. The former is a fibrillar molecule that limits the swelling pressure induced by the latter. Cartilage provides a smooth near-frictionless surface between bone extremities and also distributes forces to the underlying bone, which are better suited to absorb forces than cartilage. Although mechanical stimulation is necessary for cartilage development and homeostasis, abnormal loading has also been shown to initiate cartilage degradation. Previous studies regarding load-mediated tissue degradation have mostly focused on water content, ion-induced swelling, proteoglycan metabolism and/or histological analysis of cartilage and bone, while few have provided data on possible direct collagen denaturation *in situ* due to loads. It has been shown and modeled that under rapid unconfined compressions, the collagen network is responsible for an important part of the tissue resistance. The objective of the study in this work was to determine if collagen could be denatured by mechanical compressions, and to study underlying mechanisms. Our main hypothesis was that mechanical compressions could compromise the integrity of the collagen network, render it less functional and possibly

activate a series of collagen and proteoglycan related biochemical turnover events that are specific to mechanically loaded cartilage and not necessarily present in static cultures. To do this, we have applied a new collagen breakdown assay to precisely loaded cartilage/bone explants in order to investigate the ability of mechanical load to modulate collagen network integrity, turnover and functional mechanical properties as well as proteoglycan metabolism in this multidimensional study. We found that cyclic unconfined compression imposed on mature articular cartilage was capable of inducing a variety of changes, including immediate (in minutes) reduced mechanical properties, immediate damage (denaturation) to type II collagen, and a prolonged (for days) increase in loss of proteoglycan and collagen extracellular matrix fragments from the loaded disks to the culture medium. These results suggest that mechanical load plays an intrinsic role in the homeostatic control of collagen metabolism that is important in normal physiology as well as in cartilage degeneration.

Cartilage has a limited ability for repair; lesions often lead to progressive and generalized degradation. The second part of the thesis will focus on important events underlying cartilage regeneration in the context of tissue engineering, an emerging area of research that develops therapies using biomaterial scaffolds and/or cell transplantation in an effort to promote tissue regeneration. Targeted events of this work will be the migration of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC). These cells, already considered essential in the natural repair of full thickness cartilage lesions, possess proliferative and differentiation patterns that make them ideal candidates for their use in tissue engineering approaches, where their potential is usually harnessed by either recruitment or transplantation. Cell migration is an important process involved in all these strategies, and its comprehension is deemed important for the rational elaboration of such techniques. It is in that context that the following studies are presented.

The objectives of the second paper published in *Cell Motility and the Cytoskeleton* in November 2006 was to develop a new technique that would enable a clear and detailed observation of cells migrating in a 3D environment. Most studies

analyzing cell migration mechanisms are in two dimensions, and they seldom use MSC. The hypothesis was that the transmembrane migration assay, a quantitative assay for the migration response of a cell population, could be adapted to observe single cells migrating in the z axis. This new technique enabled us to simultaneously observe for the first time the main cytoskeletal components and the nucleus in a single cells migrating in three dimensions. Novel observations point to several differences compared to 2D migration, and suggests this method can be further applied to observe relationships with cytoskeleton associated proteins in terms of location and associations within the cell motile machinery. This method provides a tool to gain new insights into the cellular mechanisms of cell motility.

Finally, the objective of the third and last study presented in this thesis was to determine the effects of proteins of the extracellular matrix, namely fibronectin, vitronectin and collagen 1, on the motogenic behavior of MSC. MSC from both rabbit and human origin were tested based in part on the widespread use of rabbit models for musculoskeletal related tissue engineering and repair models and their unknown correspondence to human in terms of MSC migration. Furthermore, tests were done in an optimised transmembrane assay, a rare feature in these kinds of studies. Our primary finding was that all three ECM proteins mentioned above induced a significant directed migration of MSC for both rabbit and human. Directed migration was elicited by two mechanisms, namely haptotaxis and chemotaxis. These results should permit a better understanding of the distribution of these cells in the body during wound repair and also provide biological information relevant to the rational design of cell scaffolds and of bioinstructive biomaterials in the quest to improve the performance of cartilage regenerative medicine strategies.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ.....	vi
ABSTRACT	x
TABLE DES MATIÈRES	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES	xx
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xxiii
INTRODUCTION.....	1
Généralités.....	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
LE CARTILAGE ARTICULAIRE.....	5
Rôles.....	5
Composition	6
<i>Phase solide : la matrice extracellulaire</i>	<i>6</i>
<i>Phase liquide : l'eau.....</i>	<i>11</i>
Morphologie : structure et organisation	12
Propriétés mécaniques.....	13
Enzymes	16
Dégradation du cartilage	19

<i>Généralités</i>	19
<i>Facteurs mécaniques et collagène</i>	20
Réaction du cartilage aux lésions	22
LA RÉPARATION DES LÉSIONS	25
Étapes de la réparation des lésions cutanées et types cellulaires : modèle du processus.	25
<i>Formation du thrombus hémostatique</i>	26
<i>Inflammation</i>	27
<i>Tissu de granulation</i>	29
<i>Remodelage</i>	30
Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse	31
<i>Propriétés et rôles</i>	31
<i>Applications en médecine régénérative</i>	35
Migration cellulaire	38
<i>Cytosquelette</i>	38
<i>Types de migration dirigée</i>	39
<i>Processus cyclique de la migration cellulaire</i>	42
CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	47
CHAPITRE 3. DÉTAILS TECHNIQUES DE L'ÉTUDE SUR LES EFFETS DES COMPRESSIONS MÉCANIQUES SUR LES EXPLANTS DE CARTILAGE	50
Disques de cartilage.....	50
Chargement et propriétés mécaniques.....	51
Extraction du contenu de collagène dénaturé et natif et des protéoglycanes des explants cartilagineux	53
Test ELISA : dosage du collagène dénaturé dans les extraits	53

Dosage des protéoglycanes.....	56
Dosage du collagène clivé.....	56
Détection par Immunohistochimie	57

CHAPITRE 4. CYCLIC COMPRESSION OF CARTILAGE/BONE EXPLANTS IN VITRO LEADS TO PHYSICAL WEAKENING, MECHANICAL BREAKDOWN OF COLLAGEN AND RELEASE OF MATRIX FRAGMENTS

Abstract	59
Introduction	60
Methods.....	62
<i>Isolation and Culture of Cartilage/Bone Explants</i>	62
<i>Mechanical Characterization</i>	64
<i>Cyclic Loading</i>	66
<i>Total and Denatured Collagen in Disks and Media</i>	67
<i>Proteoglycan in Disks and Media</i>	68
<i>Immunohistochemical Detection of Denatured Collagen</i>	68
<i>Statistical Analysis</i>	69
Results	69
<i>Cyclic Loading and Mechanical Properties of Disks Before and After Cyclic Loading</i>	69
<i>Cell Viability</i>	70
<i>Denatured and Total Collagen in Disks and Media</i>	71
<i>Proteoglycan in Disks and Media</i>	72
<i>Distribution of Denatured Collagen by Immunohistochemical Staining</i>	73
Discussion	74
Acknowledgements	77

References	78
Figures and Figure Captions.....	85
CHAPITRE 5. DÉTAILS TECHNIQUES POUR LES PROCHAINS ARTICLES SUR L'OBSERVATION ET LA QUANTIFICATION IN VITRO DE LA MIGRATION DES CSM.....	94
<i>Test transmembranaire: essai quantitatif de la réponse chimiotactique</i>	<i>94</i>
<i>Immunocytochimie.....</i>	<i>95</i>
CHAPITRE 6. MIGRATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN 3D: 4 COLOR METHODOLOGY REVEALS SPATIALLY AND TEMPORALLY COORDINATED EVENTS	97
Abstract	97
Introduction	99
Materials and methods	103
<i>Cell Isolation and Sample Preparation.....</i>	<i>103</i>
<i>Cytoskeleton Imaging on 2D Surfaces</i>	<i>104</i>
<i>Permeabilization and Fixation.....</i>	<i>104</i>
<i>Fluorescence Labeling.....</i>	<i>108</i>
<i>Directed Cell Migration Studies in 3D</i>	<i>112</i>
Results	114
<i>Colony Formation Efficiency of BMSCs</i>	<i>114</i>
<i>Processing Method Evaluation using Triple Staining.....</i>	<i>114</i>
<i>Quadruple Cytoskeletal Labeling.....</i>	<i>117</i>
<i>Temporal Analysis of the Cytoskeleton in BMSCs Migrating Through a Porous Membrane.....</i>	<i>117</i>
Discussion	119

<i>Optimal Processing and Imaging Methodology</i>	120
<i>Directed Migration in 3D</i>	122
Conclusion.....	127
References	128
Tables	138
Figures and Figure Captions.....	140
CHAPITRE 7. Fibronectin, Vitronectin and Collagen I Induce Chemotaxis and Haptotaxis of Human and Rabbit MSC in a Standardized Transmembrane Assay	152
Abstract	152
Introduction	154
Methods.....	158
<i>Rabbit Bone Marrow Derived MSC Isolation</i>	158
<i>Human Bone Marrow Derived MSCs</i>	159
<i>Chemotaxis Assay Optimisation and Analysis of ECM Chemotractants on MSCs</i> ...	160
<i>Statistical analysis</i>	164
Results	165
<i>Rabbit Bone Marrow Derived MSC Characterization</i>	165
<i>Optimization of the Transmembrane Chemotaxis Assay</i>	165
<i>PDGF-BB Induced Chemotaxis</i>	167
<i>ECM Proteins Induced Chemotaxis</i>	167
<i>ECM Protein Induced Haptotaxis</i>	169
Discussion	170
<i>Transmembrane Chemotactic Assay Optimized by Removal of BSA and Pre-migration Cell Attachment Time and Use of Cell Starvation and Glutaraldehyde Fixation</i>	171

<i>Fibronectin, Vitronectin and Collagen I are Chemotactic and Haptotactic for MSCs</i>	173
References	178
Tables	191
Figures and Figure Captions.....	196
SYNTHÈSE GÉNÉRALE, DISCUSSION et CONCLUSION	202
RÉFÉRENCES.....	214

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 6.1: Processing methods used to fix and permeabilize cells for cytoskeleton labeling.....	138
Tableau 6.2: Probes and optical setup on Zeiss LSM 510 Meta C-Apochromat 40X/ 1.2 W objective.....	139
Tableau 7.1: Effect of Cell Fixation on Counted Cells after PDGF-induced Migration of Rabbit MSC.....	193
Tableau 7.2: Evaluation of the haptokinesis response.....	194
Tableau 7.3: PDGF-BB-induced Chemotaxis on Different Substrates.....	195

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Fibrille de collagène du cartilage articulaire.....	9
Figure 1.2 : Aggrégat de protéoglycanes.....	10
Figure 3.1 : A. Système de compressions <i>in vitro</i> de haute précision.B. Chambre de compression dynamique stérile.....	52
Figure 3.2 : Différentes phases de l'essai ELISA de type inhibition	55
Figure 4.1 :Schematic of Experimental Design and Mechanical Apparatus.....	88
Figure 4.2 :Mechanical Behavior of Cartilage Explants Before and After Cyclic Loading.....	89
Figure 4.3 : Cell Viability in Cartilage Explants Cartilage sections (60 µm thick) from 4mm disks analysed for cell viability using Molecular Probes LIVE/DEAD assay before and after cyclic loading show similar staining patterns for viable (green) versus dead (red) cells throughout the cartilage thickness for both control (A) and loaded (B) samples (Magnification: 42.5X).....	90
Figure 4.4: Denatured and total type II collagen contents of explants.....	91
Figure 4.5: Denatured type II collagen and GAG release to media during culture after loading.....	92
Figure 4.6:Immunohistochemical localization of mechanically denatured type II collagen.....	93
Figure 5.1: Shéma de la chambre modifiée Boyden, aussi appelée l'essai du filtre	

transmembranaire.....	95
Figure 6.1: Poor preservation and labeling of the cytoskeleton of BMSC in monolayer is obtained when processed with methods that are traditionally used in 2D light microscopy.....	144
Figure 6.2: Acceptable methods for 2D preservation and labeling of the cytoskeleton of BMSC in monolayer.....	145
Figure 6.3: Cell height measurements for the assessment of 3D morphological preservation of processed BMSCs in monolayer.....	146
Figure 6.4: Cell height measurements on live cells (DiI) and after various fixation methods.....	147
Figure 6.5: Cytoskeleton and nuclear labeling using the 4 color method (details in Table 1) for BMSCs on glass coverslips and on polycarbonate membrane inserts.....	148
Figure 6.6: Chemotaxis of rabbit BMSCs in response to hPDGF. Rabbit BMSCs were seeded onto polycarbonate membrane inserts with 8 μ m pores at 40,000 cells per insert.....	149
Figure 6.7: Time series of BMSC migration through a porous polycarbonate membrane in response to 50ng/ml hPDGF in a transwell insert.....	150
Figure 6.8: Cytoskeletal organization and distribution in 3D for BMSCs migrating through porous polycarbonate membranes membrane in response to 50ng/ml hPDGF in a transwell insert.....	151
Figure 7.1: The presence of time for cell attachment to the membrane prior to	

establishing the chemoattractant gradient reduced cell migration (A) as did the presence of soluble BSA (B).....	198
Figure 7.2: Specific and dose-dependent chemotaxis of rabbit and human MSCs toward PDGF-BB (A) occurred, but not towards TGF β 1 (B) nor FGF-2 (C).....	199
Figure 7.3: Dose-dependent chemotaxis of rabbit and human MSCs toward soluble RGD-containing extracellular matrix proteins Fn (A), Vn (B) and Col1 (C).....	200
Figure 7.4: Dose-response for haptotaxis of rabbit and human MSCs toward insoluble surface-bound ECM components Fn (A), Vn (B) and Col1 (C).....	201

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ACT	alphachymotrypsine
BMP	bone morphogenic protein
BMSC	bone marrow stromal cells
BSA	albumine sérique bovine
Col1	collagène de type I
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CSM	cellules souches mésenchymateuses
DMB	bleu de diméthylméthylène
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblaste growth factor
Fn	fibronectine
GAG	glycosaminoglycane
MEC	matrice extracellulaire
MMP	matrice métalloprotéinase
OA	osteoarthrite
PDGF	platelet derived growth factor
PG	protéoglycanes
PK	protéinase K
RE	réticulum endoplasmique
RGD	tripeptide arginine glycine acide aspartique
TGFβ	transforming growth factor beta

INTRODUCTION

Généralités

Les articulations humaines sont des systèmes très complexes, formés d'une multitude de tissus en interactions qui possèdent aussi chacun un rôle métabolique et mécanique distinct. Les travaux de cette thèse portent sur le cartilage articulaire, situé à l'extrémité des os longs, tissu qui agit comme amortisseur et procure un environnement sans friction aux jointures diarthrodiales. L'état pathologique abordé parallèlement est l'arthrose, ou ostéoarthrite, caractérisée par la dégradation progressive du cartilage par des mécanismes non-inflammatoires. Cette pathologie affecte trois millions de Canadiens (Société d'arthrite, 2006), et demeure la cause numéro un des incapacités physiques au Québec (Agence de la santé et services sociaux du Québec, 2006). L'arthrose a donc des impacts sociaux et économiques importants. Considérée maintenant comme une maladie et non comme une manifestation inéluctable du vieillissement, ses causes exactes sont encore méconnues.

Les premiers signes de la dégradation du cartilage sont une diminution du contenu des protéoglycanes (PG), une perturbation du réseau de collagène et une augmentation du contenu en eau, conduisant à un ramollissement du cartilage (Buckwalter et Mankin 1998). Alors que le rétablissement des PG est possible, on pense que les perturbations du réseau de collagène sont permanentes (Setton, Mow, Muller, Pita and Howell 1997). Le cartilage est un tissu qui n'a qu'une capacité limitée de

réparation : une lésion entraîne généralement avec le temps une dégradation généralisée. La stimulation de la moelle osseuse, par laquelle on provoque un saignement de l'os sous le cartilage, propose une solution prometteuse, mais les résultats cliniques indiquent une dégradation avec le temps (Shapiro, Koide et Glimcher 1993). Les méthodes chirurgicales, ou arthroplastie articulaires dont on entend souvent parler, donnent des résultats relativement satisfaisants chez les patients atteints d'une dégradation généralisée du cartilage, mais leur durée de vie relativement courte fait de cette stratégie une mauvaise option pour les jeunes patients (Buckwalter et Mankin 1998). Il est donc impératif de connaître les mécanismes sous-jacents de cette pathologie de façon à pouvoir développer des stratégies de régénération qui assistent ou amplifient la réponse naturelle du corps, provoquent la guérison de lésions focales par la formation d'un tissu biomécaniquement stable, empêchent la dégradation progressive et permettent d'éviter les arthroplasties articulaires invasives, très coûteuses et à effets temporaires.

Les travaux de cette thèse se divisent en deux volets. Le premier porte sur l'étude des aspects mécaniques et enzymatiques de la dégradation du cartilage, le second est consacré à certains aspects prometteurs de la régénération du cartilage dans le cadre de la médecine régénérative. Plus précisément, le premier volet s'intéresse aux effets des compressions mécaniques uniaxiales sur l'intégrité mécanique et biochimique de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. Le deuxième volet étudie le comportement mobile des cellules souches de la moelle osseuse. Et puisque le cartilage articulaire est le fil conducteur de cette thèse, nous commençons au chapitre 1 par une

revue de la composition, des fonctions, de la dégradation et du caractère limité des mécanismes naturels de réparation de ce tissu. La nature avasculaire du cartilage y est abordée pour expliquer en partie les capacités de réparation limitées du cartilage articulaire. Le concept de réparation des tissus vascularisé est ensuite introduit dans la deuxième section du chapitre 1 pour expliquer les bienfaits de l'induction chirurgicale du saignement. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse, qui participent à la réparation du cartilage dans ces conditions (Shapiro, Koide et al. 1993), seront alors abordées. Le chapitre 1 présente aussi un mécanisme essentiel au processus de guérison des plaies, soit la migration cellulaire. Les problématiques, objectifs et hypothèses qui motivent ce projet sont ensuite exposés au chapitre 2.

Le chapitre 3 précise certains détails techniques de l'article qui fait l'objet du chapitre 4. Cet article avait comme objectif de conforter nos hypothèses qui prévoyaient en somme une altération matricielle au niveau du collagène induite par compressions mécaniques uniaxiales non-confinées. Par la suite, le travail se réoriente vers les stratégies de réparation.

Le chapitre 5 est consacré aux détails expérimentaux qui ont permis de mettre en place les techniques qui font l'objet des chapitres 6 et 7, des articles portant sur la migration des CSM. Ces CSM sont un type de cellules souches que l'on retrouve chez l'adulte et qui sont largement testées en génie tissulaire (Caplan 2005). La migration cellulaire est essentielle à tout processus de guérison, qu'il s'agisse de mécanismes naturels ou assistés (Silva et Mooney 2004). Plusieurs s'accordent pour dire que la

essentielle si l'on veut les appliquer à des stratégies de génie tissulaire ou de médecine régénératrice. L'objectif du premier article de ce deuxième volet était d'élaborer une nouvelle technique de caractérisation de la migration des CSM. Cette technique combine l'imagerie confocale, les marquages fluorescents multiples et la migration tridimensionnelle permettant l'étude de ce phénomène par l'observation du cytosquelette en haute résolution. Cette technique promet de révéler des phénomènes jamais observés jusqu'ici. Les images semblent même suggérer que la technique pourrait être appliquée à l'élaboration de protocoles destinés à l'analyse fondamentale des mécanismes de migration en trois dimensions de n'importe quel type de cellule. Dans la même optique, le deuxième article de ce volet, présenté au chapitre 8, avait pour objectif d'identifier des éléments qui aident à la guérison naturelle ou assistée des plaies et qui pourrait influencer la mobilité de ces cellules. Alors que plusieurs agents comme les cytokines ont été identifiés (Caplan 2005), les protéines de la matrice extracellulaire n'ont jamais été testées pour leur potentiel à induire une mobilité des CSM. L'identification de ces facteurs chimiotactiques pourrait aider au design de biomatériaux biofonctionnels capables de guider les CSM vers le site de la lésion et de contrôler leur distribution. La prochaine section contient une revue des sujets importants pour l'appréciation de ces travaux.

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTERATURE

LE CARTILAGE ARTICULAIRE

Le cartilage articulaire, aussi nommé cartilage hyalin, apparaît comme une matière inerte présente à l'extrémité des os. Ce n'est que depuis quelques années qu'il est considéré comme un tissu vital composé de matériaux polymériques complexes qui adoptent une structure très ordonnée sous contrôle métabolique des chondrocytes via différentes interactions. À l'heure actuelle, le cartilage et les maladies qui s'y rapportent, l'ostéoarthrite (OA) en tête de liste, forment un champ d'activité scientifique très actif où les connaissances s'accumulent à une vitesse vertigineuse.

Rôles

Le cartilage articulaire est le tissu recouvrant l'extrémité des os au niveau des jointures diarthrodiales. Il assure une surface congruente et sans friction entre les deux extrémités osseuses; il protège les articulations en distribuant les forces appliquées de façon à prévenir les concentrations de contraintes dommageables. Sa nature viscoélastique et sa minceur en font toutefois un mauvais absorbeur de chocs (Setton et Mow 1997). Le cartilage transmet et distribue les forces générées par le mouvement aux os, mieux adaptés à l'absorption de contraintes (Jeffrey, Gregory and Aspden 1995). Les propriétés mécaniques du cartilage sont des conséquences directes de sa structure et de sa composition.

Composition

Le cartilage est un matériau biphasique non-homogène constitué d'une phase liquide et d'une phase solide. La phase liquide, l'eau et les électrolytes, représente environ 75% du volume total. La phase solide, soit environ 25% du volume, est une matrice extracellulaire (MEC) composée de collagènes, de protéoglycanes (PG) et de diverses protéines non-collagèneuses (glycoprotéines). Ces macromolécules adoptent un arrangement tridimensionnel complexe en équilibre avec la phase liquide, conférant au cartilage des propriétés mécaniques uniques (Buckwalter and Mankin 1998). Les cellules occupent quant à elle de 1 à 10% du volume tissulaire (Kresse 1992).

Phase solide : la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est synthétisée et structurée par les chondrocytes encastrés dans celle-ci. Les chondrocytes assurent, en condition physiologique, un équilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants de la matrice responsable des propriétés du cartilage. Les propriétés mécaniques remarquables du cartilage sont directement reliées au contenu en eau du tissu, maintenu en place dans la matrice par les PG, lesquels sont à leur tour enchevêtrés et stabilisés dans un réseau de fibrilles de collagène hautement organisé qui prévient l'expansion non-optimale du tissu (Buckwalter and Mankin 1998a).

La presque totalité du collagène du cartilage adulte (95%) est le collagène de type II. Le reste appartenant aux collagènes de type VI, IX, X, XI et III. Le collagène II est

une molécule hélicoïdale formée de trois chaînes alpha synthétisées presque exclusivement par les chondrocytes (Lisenmayer 1991). En conditions physiologiques (PH 7 et 37°C), ces molécules s'agencent par liens chimiques (ponts disulfides) pour former des fibrilles qui s'organisent ensuite dans un réseau tridimensionnel responsable de la rigidité en tension du tissu (Eyre and Wu 1995). Cette conformation en triple hélice confère à la molécule, non seulement une bonne résistance en tension, mais contribue aussi au clivage protéolytique des différentes enzymes connues du cartilage présentes dans la MEC. Seules quelques enzymes spécifiques, les collagénases, peuvent cliver le collagène natif (Cremer, Rosloniec and Kang 1998).

Le gène encodant du collagène type II fait partie d'une famille de gènes commune à tous les collagènes fibrillaires, soit les types I, II, III, V et XI (11). Les gènes de collagène type I et II sont particulièrement similaires, suggérant une duplication génétique récente (en terme d'évolution de l'espèce) d'un même gène ancestral (Olsen 1991). Les chaînes polypeptidiques individuelles du collagène II, ou chaînes alpha, sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) des chondrocytes sous forme de prochaîne alpha, précurseurs munis à chaque extrémité (amino et carboxy terminale) de propeptides (acides aminés additionnels). Des modifications post-traductionnelles comme l'hydroxylation de certaines prolines et lysines pour former l'hydroxyproline et l'hydroxylysine, respectivement, et la glycosylation de certaines hydroxylysines ont ensuite lieu dans le RE une fois la translocation terminée (Olsen 1991). Les chaînes alpha sont caractérisées par la répétition du tripeptide Gly, X, Y où X est souvent une

proline et Y une hydroxyproline. Dans la cellule, ces chaînes alpha se combinent trois par trois par des liens hydrogènes et des ponts disulfides pour former une triple hélice, le procollagène (McLaughlin and Bulleid 1998). Les groupements hydroxyles des acides aminés hydroxylysines et hydroxyprolines sont responsables en partie des liens hydrogènes qui stabilisent la triple hélice (Van der Rest and Garrone 1991).

Après sécrétion dans l'espace extracellulaire, la région non-hélicoïdale à chaque extrémité du procollagène, les propeptides, sont clivés par les protéinases N et C spécifiques (Prockop, Sieron and Li 1998). Ce clivage laisse à chaque extrémité de petites régions non-hélicoidales de 10 à 15 résidus, les télopeptides, et permet aux collagènes de s'assembler spontanément en fibrilles de collagène (10 à 300nm de diamètre) pour ensuite s'agréger en fibres de collagène (0.5 à 3 μ m de diamètre). Les fibrilles sont principalement faites d'un assemblage de collagènes II qui s'agrègent autour d'un cœur formé de collagènes XI. La surface est ensuite recouverte par du collagène IX (Brewton and R.Mayne 1993). Des liens covalents inter et intra moléculaires sont ensuite formés entre les groupements aldéhydes des résidus lysines et hydroxylysines déaminés par la lysyl oxidase; on les retrouve majoritairement au niveau des télopeptides. Ils participent grandement à la résistance en tension de la molécule et du réseau (Brewton and R.Mayne 1993). D'autres macromolécules du cartilage, comme la décorine et la fibromoduline, participent aussi à l'assemblage, à la stabilisation et à l'agrégation des fibrilles et des fibres de collagène (Bruckner and van der Rest 1994). Agissant comme des câbles, les fibres de collagène assurent la rigidité en tension du

cartilage.

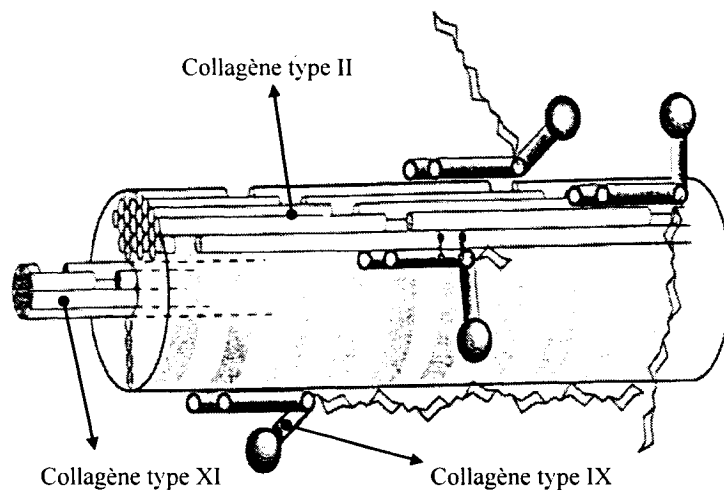


Figure 1.1: Fibrille de collagène du cartilage articulaire (Modifiée de Bruckner P. et Vander rest M., 1994)

Les protéoglycanes (PG)

Les protéoglycanes se composent d'une ou de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) liés à une protéine centrale (core protéine). Chaque PG est lié à l'acide hyaluronique au moyen d'une protéine de liaison (link protéine). On trouve trois types de PG dans le cartilage, l'aggrécane (le plus abondant), le byglycane et le décorine (Kresse 1992). Les GAG consistent en une chaîne de disaccharides contenant au moins un groupement sulfate ou carboxyle chargé négativement. Dans le cartilage articulaire, trois types de GAG peuvent s'attacher à la protéine centrale pour former un

PG, soit le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate et le dermatane sulfate. Il peut y avoir jusqu'à 150 de ces chaînes dans un PG (Rosenberg and Bulkwalter 1986). La protéine centrale des PG se lie par son extrémité NH₂ à l'acide hyaluronique. Deux domaines globulaires forment cette région N terminale de la protéine, laquelle comprend peu de GAG. Ces deux domaines jouent un rôle dans la liaison avec l'acide hyaluronique via la protéine de liaison. L'acide hyaluronique joue un rôle dans la stabilisation et l'organisation de l'encastrement des PG à l'intérieur du réseau de collagène (Tang, Bulkwalter and Rosenberg 1996).

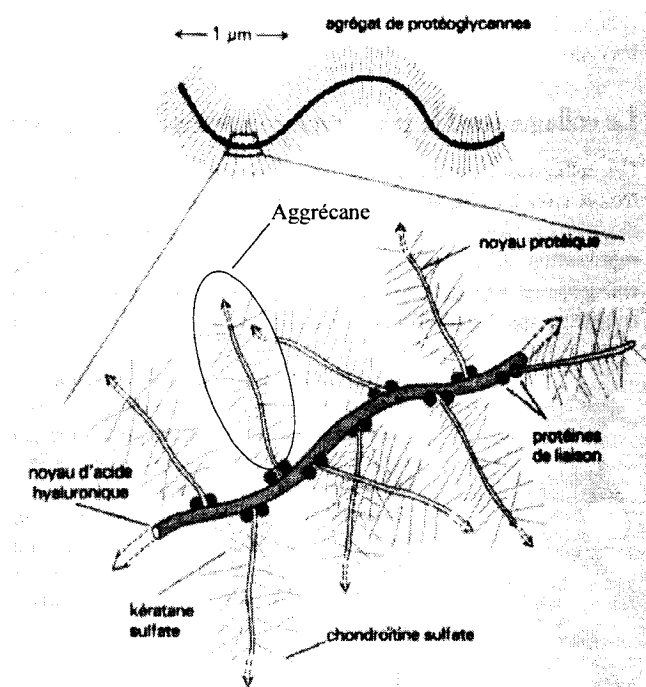


Figure 1.2 : Agrégat de protéoglycanes (Modifiée de Alberts B. et al., 1989)

Les PG sont des molécules chargées négativement qui attirent l'eau par osmose

et assurent l'hydratation du tissu. Ils sont très concentrés dans le tissu où ils forment des pores d'environ 20-25 Å (Bank, Krikken, Beekman, Stoop, Maroudas, Lafeber and Koppele 1997). La haute densité de ces molécules chargées négativement engendre une force de répulsion entre les charges ainsi qu'une force osmotique de gonflement substantielle. Ces deux forces assurent en grande partie la rigidité en compression du tissu (Rosenberg and Bulkwalter 1986).

Phase liquide : l'eau

Une caractéristique surprenante du cartilage hyalin est que 60% à 80% de son poids hydraté vient de l'eau. Le fluide tissulaire contient des métabolites cellulaires, des petites protéines, des gaz et une forte concentration de cations pour compenser les protéoglycanes chargés négativement. Le volume, la concentration et la diffusion de cette phase dépendent en grande partie de l'interaction avec les PG responsables du maintien du fluide dans la matrice et de la concentration ionique de ce fluide (Buckwalter and Mankin 1998a). La concentration ionique élevée du fluide cause une augmentation de l'osmolarité du tissu, créant un effet Donnan (attraction osmotique de l'eau dans le tissu pour équilibrer les concentrations). Ce processus a pour effet d'exercer une pression osmotique de gonflement du cartilage, à son tour contenu par le collagène (Maroudas and Schneiderman 1987). L'interaction entre l'eau et les macromolécules de la MEC, particulièrement les PG, influence donc les propriétés mécaniques du tissu. Une certaine quantité d'eau peut se diffuser dans le tissu et à l'extérieur, surtout lors de compressions. Il semble que cette diffusion d'eau joue un rôle

dans la lubrification des jointures, dans la nutrition des chondrocytes et dans le comportement viscoélastique du tissu (Newman 1998).

Morphologie : structure et organisation

L'orientation et la concentration des constituants de la MEC varient à deux niveaux : selon l'éloignement de la surface du tissu (profondeur) et selon la distance entre les cellules à l'intérieur de la matrice (Buckwalter and Mankin 1998a). L'organisation zonale du cartilage a une importance fonctionnelle (Poole, Flint and Beaumont 1984). Selon la profondeur, le cartilage est principalement divisé en quatre couches. 1) La surface ou couche superficielle se caractérise par des fibrilles de collagène orientées parallèlement à la surface, une faible densité de protéoglycanes et des chondrocytes de forme allongée. 2) La zone de transition est formée de fibres de collagène de plus gros diamètre adoptant une orientation aléatoire, de cellules plus rondes et d'une plus grande densité de PG. 3) Dans la zone profonde, les cellules sphériques forment des colonnes et les fibres de collagène adoptent une orientation verticale, perpendiculaire et pénétrant dans la couche sous-jacente. 4) La couche la plus profonde forme une zone calcifiée qui sépare et retient le cartilage à l'os subchondral. Certaines fibres de collagène de la zone profonde pénètrent la zone calcifiée et s'ancrent directement dans l'os (Poole, Pidoux, Reiner and Rosenberg 1982).

Par rapport aux cellules, on peut distinguer trois régions: une région péricellulaire, une région territoriale et une région inter-territoriale. Entre chacune de ces

régions, il y a variabilité au niveau des contenus en macromolécules et de leur organisation. La région qui entoure immédiatement la cellule, soit la région péricellulaire, se caractérise par une abondance de PG et la présence de très peu de collagène. La région territoriale forme autour de la région péricellulaire une sorte de toile dense de collagène qui semble protéger les cellules des forces mécaniques, lesquelles sont gérées par la région inter-territoriale, responsable en grande partie des propriétés mécaniques du cartilage. Ces cellules ne comptant que pour 5% du volume tissulaire, on comprendra que la région inter-territoriale occupe la plus grande part du cartilage (Poole, Flint et al. 1984).

Propriétés mécaniques

Les mouvements et la locomotion sont possibles grâce aux jointures diarthroïdiales. Tout au long de la vie, le cartilage articulaire subit des forces de tension, de cisaillement et surtout de compression (Hodge, Fijan, Carlson, Burgess, Harris and Mann 1986). Comme pour tous les tissus biologiques, la fonctionnalité du tissu découle directement de sa composition et de sa structure, et vice-versa. Sous l'aspect mécanique, on peut considérer le cartilage comme un matériau hétérogène et multiphasique, formé d'un composite poreux anisotrope saturé par un fluide. L'intime relation entre structure et propriétés mécaniques a fait l'objet de plusieurs études qui, pour la plupart, emploient une variété de tests mécaniques et de modèles analytiques pour caractériser mécaniquement le cartilage articulaire (Woo, Lubock, Gomez, Jemmott, Kuei and

Akeson 1979). Il a été démontré que la rigidité en tension du tissu (*module en tension*) dans des plans parallèles à la surface varie en fonction de la profondeur, possiblement à cause des concentrations et des orientations différentes du collagène (Kempson, Muir, Pollard and Tuke 1973; Woo, Lubock et al. 1979). Des études animales ont révélé que la concentration de PG est plus élevée dans le cartilage chargé fréquemment (Kiviranta, Jurvelin, Tammi, Saamanen and Helminen 1987). D'autres travaux ont aussi démontré que, dans une même jointure, la rigidité du cartilage était plus élevée dans les régions de chargement faible que dans les régions de chargement élevé, ce qui fait apparaître une corrélation nette entre le ratio collagène/PG et le *module en tension* du tissu (Akizuki, Mow, Muller, Pita, Howell and Manicourt 1986).

À l'équilibre, le collagène exerce une tension égale à la force osmotique générée par les PG, limitant le gonflement du tissu. Les contraintes de tension dans le collagène et même l'intégrité du réseau peuvent en fait être déterminées par l'hydratation du tissu (Basser, Schneiderman, Bank, Wachtel and Maroudas 1998). La faible perméabilité de la matrice, due à la grande densité des molécules qui la composent, confère au tissu un comportement mécanique viscoélastique lorsqu'il est soumis à des compressions (Mow, Holmes and Lai 1984). Lors de compressions, le cartilage adopte instantanément un comportement élastique, sans écoulement de fluide. Lorsque la compression est soutenue, le cartilage adopte un comportement viscoélastique du au mouvement de fluide à travers la matrice, pour finalement atteindre l'équilibre. La réaction biphasique du cartilage dépend du taux et du niveau de déformation, des paramètres de chargement,

des conditions ioniques du milieu environnant, de la composition biochimique et de l'organisation des macromolécules (Akizuki, Mow et al. 1986). Le fluide interstitiel peut se diffuser à l'extérieur de la matrice, pour se rediffuser à l'intérieur lorsque les compressions sont enlevées. La pressurisation du liquide lors de sa redistribution à travers la matrice solide - due à la résistance à l'écoulement généré principalement par les GAG et aussi par le collagène - et l'augmentation de la pression électrostatique de gonflement - due au rapprochement des GAG - sont responsables de la résistance du cartilage aux déformations; elles empêchent une exsudation excessive de fluide (Muir, Bullough and Maroudas 1970). Les compressions rapides génèrent quant à elles un comportement élastique du cartilage, le fluide n'ayant pas le temps de se diffuser. Dans ce cas, la résistance aux compressions est assurée principalement par la phase solide, soit la MEC.

In vitro, les compressions non confinées permettent une extension latérale du tissu perpendiculaire à l'axe de compression, générant des forces additionnelles de tension dans la partie solide du tissu (Mow, Holmes et al. 1984). Ces forces de tension s'ajoutent aux forces de friction/cisaillement causées par l'écoulement du fluide dans la matrice qui créent de la friction. Dans un système *in vivo*, il se produit une extension similaire du tissu autour de la zone de compression, ce qui pourrait expliquer la rigidité en tension plus élevée dans le tissu autour de la zone de compression, que nous avons vu plus haut (Akizuki, Mow et al. 1986). Des tests en compression non confinée ont aussi permis de démontrer que le module de rigidité du tissu augmente de façon non-linéaire

avec l'augmentation linéaire des déformations. Cette observation a incité notre groupe à élaborer un modèle analytique biphasique composite pour représenter ce comportement (Soulhat, Buschmann and Shirazi-Adl 1999). Ne tenant pas compte du réseau de collagène, les modèles biphasiques poroélastiques existants ne peuvent pas simuler ce comportement.

Le modèle biphasique composite permet d'obtenir les propriétés comme le module en tension des fibrilles de collagène E_f (qui dépend de l'intégrité du collagène), la perméabilité k (qui dépend du contenu en PG et de leur rétention par le collagène) et le module de compression à l'équilibre E_m (qui dépend à la fois des forces électrostatiques des PG et élastique du collagène) (Soulhat, Buschmann et al. 1999). Ce modèle a d'ailleurs été validé avec des protocoles de dégradation enzymatique contrôlée, observant une corrélation directe entre les paramètres mécaniques et la dégradation du collagène et des PG (Korhonen, Laasanen, Toyras, Lappalainen, Helminen and Jurvelin 2003). Une étape importante de notre étude consistera à identifier les relations entre les propriétés mécaniques et les altérations de la matrice induites mécaniquement au niveau du collagène. Cet objectif sera discuté plus en détails dans l'article du chapitre 4.

Enzymes

Le cartilage remplit son rôle biomécanique en assurant le maintien de l'intégrité de la matrice par les cellules du tissu, les chondrocytes, qui sont dispersées ici et là dans le tissu et occupent entre 1 et 10 % du volume. Les chondrocytes, cellules dérivées des

CSM, maintiennent l'équilibre entre la synthèse, l'assemblage, la dégradation et le contenu des macromolécules de la matrice. L'adaptation du cartilage à différents environnements, à différentes demandes mécaniques, s'effectue par la transduction des signaux mécaniques (méchanotransduction) de la matrice vers les cellules, amorçant la réaction biologique appropriée (Buschmann, Gluzband, Grodzinsky and Hunziker 1995). Les mécanismes par lesquels les cellules réagissent à leur environnement mécanique font l'objet de plusieurs études mais ils restent encore méconnus.

Les cellules maintiennent l'homéostasie tissulaire en remodelant la MEC à l'aide de plusieurs agents, notamment des enzymes protéolytiques de la matrice extracellulaire. Ces enzymes interviennent dans le renouvellement normal des macromolécules (surtout pendant le développement) ou dans leur destruction pathologique (Shingleton, Hodges, Brick and Cawston 1996). Les enzymes sont soit intracellulaires, comme les cystéines et les aspartics protéases, qui opèrent à des pH acides, soit extracellulaires comme les sérines et métalloprotéinases, qui agissent à un pH neutre (Shingleton, Hodges et al. 1996).

Les collagénases (MMP1, 8 et 13) appartiennent à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP), qui comprend aussi les stromelysines (MMP3, 10 et 11) et les gélatinases (MMP 2 et 9). Les métalloprotéinases sont des protéinases qui : 1) dégradent au moins un constituant de la matrice extracellulaire, 2) contiennent un ion zinc et sont inhibées par des agents chélateurs, 3) sont sécrétées sous forme latente (proenzyme ou zymogène) et requièrent une activation pour exercer la protéolyse,

4) sont inhibées par des inhibiteurs tissulaires spécifiques des MMP, les TIMP, et 5) ont une similarité au niveau de leurs acides aminés (Matrisian 1990). L'activité des MMPs dépend d'un équilibre entre la synthèse, l'activation et l'inhibition (Kozaci, Buttle and Hollander 1997). Seules les collagénases peuvent cliver la triple hélice de collagène natif. Les autres MMP clivent le collagène déjà déroulé (par les collagénases par exemple) et les régions non hélicoïdales du collagène (télopeptides) ainsi que les protéoglycanes (PG). Le clivage de la triple hélice a lieu à un site unique sur la molécule, les fragments produits représentant du quart au trois quarts de la molécule initiale (Billinghurst, Dahlberg, Ionescu, Reiner, Bourne, Rorabeck, Mitchell, Hambor, Diekmann, Tschesche, Chen, Van Wart and Poole 1997) . Ces fragments ne sont pas stables à 37°C; la triple hélice se déroule et les chaînes de polypeptides peuvent être clivées par d'autres protéases en fragments solubles et diffusibles à l'extérieur du tissu dans le fluide synovial.

Les changements structuraux amorcés par les enzymes en situation pathologique sont souvent irréversibles, car la capacité du cartilage à se réparer est très limitée. Des dégradations ponctuelles induites mécaniquement peuvent donc affaiblir le tissu qui continuera à se dégrader sous l'effet des enzymes et à cause de ses rôles biomécaniques, même quand le facteur initial a disparu, pour aboutir à un état pathologique telle l'OA et déclencher les symptômes qui y sont associés.

Dégradation du cartilage

Généralités

Les problèmes articulaires représentent une cause majeure d'invalidité. L'ostéoarthrite, qui se traduit par une dégradation du cartilage articulaire, est le désordre articulaire le plus courant: elle touche au delà de 65% des personnes âgées de 65 ans et plus, ainsi que plus de 15% des moins de 65 ans (Kraus 1997). Les traitements et thérapies disponibles à ce jour sont surtout palliatifs, les symptômes apparaissant généralement à des stades avancés de la dégradation.

L'OA est un processus pathologique dynamique correspondant à une perte progressive du cartilage articulaire accompagnée par une tentative cellulaire de réparation du cartilage, un remodelage et une sclérose de l'os subchondral et, dans plusieurs cas, à la formation de cistes osseux et d'ostéophytes (Poole, Rizkalla, Ionescu, Reiner, Brooks, Rorabeck, Bourne and Bogoch 1993). En gros, on peut diviser le processus en trois stades : 1) altération de la matrice, 2) réaction chondrocytique aux dommages et, 3) diminution de cette réaction associée à la perte progressive du tissu et aux signes histologiques mentionnés ci-dessus (Lippiello, Hall and Mankin 1977). L'OA ne met pas en cause seul le cartilage, mais aussi l'os subchondral. L'étude de la pathophysiologie de l'OA requiert donc qu'on tienne compte de l'interrelation entre ces deux éléments. L'OA se développe généralement sans cause connue (idiopathique). Elle peut cependant apparaître parfois suite à une blessure, un traumatisme à une jointure,

une infection ou encore à cause d'un désordre héréditaire (génétique) ou métabolique (Kraus 1997). Les changements histologiques observés dans le cartilage atteint d'OA avancée sont les fissures verticales et la fibrillation superficielle du tissu qui s'étend vers les zones plus profondes, la perte de protéoglycanes, la formation de colonies cellulaires, le remodelage de l'os subchondral et l'amincissement général du cartilage (Mankin 1974).

Compte tenu de l'hétérogénéité des études, il est difficile de se faire une idée exacte des causes et des mécanismes étiologiques responsables de cette altération primaire de la MEC. Reste cependant que nous possédons de nombreuses indications à l'effet que les facteurs mécaniques jouent un rôle prépondérant dans le déclenchement de l'OA.

Facteurs mécaniques et collagène

Les stimulations mécaniques peuvent induire différentes réactions métaboliques et elles sont considérées comme nécessaires à la croissance et au maintien du cartilage. Des études *in vitro* avec des chondrocytes encastrées démontrent que l'application de contraintes dynamiques peut stimuler la synthèse de matrice (Buschmann, Gluzband et al. 1995), alors que d'autres types de stimulation, comme les contraintes statiques, peuvent être néfastes pour le tissu (Sah, Doong, Grodzinsky, Plaas and Sandy 1991). Une diminution du métabolisme tissulaire par les compression statiques est aussi observée au niveau de l'explant de la plaque de croissance (Villemure, Chung, Seck,

Kimm, Matyas and Duncan 2002; Villemure, Chung, Seck, Kimm, Matyas and Duncan 2005). Certaines études épidémiologiques associent le surmenage musculosquelettique, les traumatismes, l'obésité et plusieurs autres conditions ayant un impact mécanique sur le cartilage comme facteurs de risques majeurs (Kraus 1997). Un environnement mécanique altéré, comme une instabilité articulaire induite par chirurgie, provoque avec le temps la dégradation du cartilage chez l'animal, possiblement par des modifications cellulaires ou matricielles médiées par les chargements (Brandt, Myers, Burr and Albrecht 1991). Les modèles animaux qui ont réussi à recréer en quelques mois des symptômes semblables à ceux de l'OA - comme le modèle RIL pour repetitive impulsive loading (Radin and Paul 1971) - sont construits à partir de l'application de forces mécaniques anormales ou par la création d'un environnement mécanique altéré des jointures, comme une angulation varus/valgus du tibia (Wu, Burr, Boyd and Radin 1990) ou la transection du ligament croisé antérieur avec une ménissectomie médiale (Hulth, Lindberg and Telhag 1970). Des chargements *ex vivo* ou *in vitro* peuvent aussi altérer l'intégrité de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire pour produire des changements ostéoarthritiques (Thompson, Oegema, Lewis and Wallace 1991; Farquhar, Xia, Mann, Bertram, Burton-Wurster, Jelinski and Lust 1996).

Par ailleurs, des modifications génétiques au niveau des gènes de collagène d'embryons peuvent aussi induire une condition OA lors du développement (Pun, Moskowitz, Lie, Sundstrom, Block, McEwen, Williams, Bleasel, Holderbaum and Haqqi 1994) impliquant cette fois-ci le collagène dans l'éthiopathogénèse de cette maladie. Un

des premiers signes de l'OA chez l'humain et l'animal est une augmentation du contenu hydrique et le gonflement du tissu (Bonassar, Frank, Murray, Paguio, Moore, Lark, Sandy, Wu, Eyre and Grodzinsky 1995). On pense que ce gonflement pourrait être dû à une fibrillation du réseau de collagène qui devient par la suite incapable de limiter la force de gonflement des protéoglycanes. Un endommagement du réseau fibrillaire est en fait considéré comme une étape critique de l'OA, d'autant que le taux de renouvellement du collagène dans le cartilage adulte est très faible (Billinghurst, Dahlberg et al. 1997). Modèles et symptômes nous indiquent que les facteurs mécaniques et la molécule de collagène peuvent être deux éléments importants de l'éthiopathogénèse de l'OA.

Réaction du cartilage aux lésions

Si l'éthiopathogénèse exacte de la dégradation du cartilage dans l'OA reste obscure, les symptômes, eux, sont bien connus avec, en tête de liste, la douleur et la perte de fonctionnalité de la jointure atteinte. La capacité du cartilage articulaire à se réparer est, contrairement aux autres tissus du corps, très limitée et elle tend à se dégrader avec le temps. Ce problème explique pourquoi cette affliction représente un tel fardeau socio-économique dans une société à population vieillissante. La nature avasculaire du cartilage et la forte teneur en protéoglycanes de la MEC du cartilage sont les deux grandes causes du phénomène (Newman 1998; Buckwalter and Mankin 1998b). L'absence de vaisseaux sanguins et de toutes les cellules qui y sont associées empêchent le déclenchement d'une phase inflammatoire, ce qui rend impossible la cascade

d'évènements propices à la cicatrisation des lésions qui est habituellement amorcée par des composants du sang. Quant à elle, la matrice riche en PG forme un environnement 3D anti-migratoire pour les chondrocytes, empêchant donc que ces cellules ne s'accumulent au site des lésions en quantité suffisante pour déclencher la synthèse *de novo* de la matrice. Une certaine réaction anabolique se produit par contre à la suite d'une lésion, réaction marquée par une prolifération des chondrocytes périphériques à la lésion, lesquels provoquent une stimulation de synthèse de la matrice. Cette réaction est généralement insuffisante, et la cicatrisation souvent incomplète (Newman 1998). D'autres études n'ont pas relevé cette réaction mais plutôt une mort cellulaire en périphérie de la lésion (Shapiro, Koide et al. 1993).

Par contre, les lésions chondrales qui pénètrent l'os souschondral, hautement vascularisé, jouissent d'une capacité de réparation supérieure. Ces lésions bénéficient d'un conduit avec l'os vascularisé, ce qui permet la formation d'un caillot de fibrine et l'entrée en scène des mécanismes usuels de cicatrisation, comme nous le verrons au chapitre suivant. Ce conduit permet aussi la migration de cellules de la moelle osseuse, parmi lesquelles il faut distinguer une population de cellules progénitrices, les cellules souches mésenchymales (CSM), qui jouent un rôle important dans la réparation (Shapiro, Koide et al. 1993). Ce type de lésion se cicatrise finalement en tissu fibrocartilagineux au niveau du cartilage. Malheureusement, ce tissu de réparation ne possède pas les propriétés mécaniques du cartilage hyalin initial et se dégrade progressivement avec la reprise des activités (Shapiro, Koide et al. 1993; Wei, Gao and Messner 1997).

Les étapes de guérison de lésions ou de plaies sont vues à la prochaine section de ce chapitre.

LA RÉPARATION DES LÉSIONS

Ce chapitre est consacré aux mécanismes classiques de guérison des plaies. On pourra ainsi mieux comprendre pourquoi la réparation est meilleure quand il s'agit de lésions sous-chondrales qui atteignent l'os ainsi que l'intérêt des techniques chirurgicales de stimulation de la moelle osseuse. Cette section introduira du même coup deux autres sujets importants de la présente thèse, soit la migration cellulaire et, en particulier, la migration des cellules souches mésenchymateuses de la moelle (les CSM), le tout dans le contexte de la régénération du cartilage par des stratégies de génie tissulaire. Une attention particulière est portée aux facteurs chimiotactiques testés dans les articles suivants et sur les fibroblastes, cellules d'origine mésenchymateuse.

Étapes de la réparation des lésions cutanées et types cellulaires : modèle du processus.

Sauf indication au contraire, l'information contenue dans cette section provient de (Clark 1996).

La cicatrisation des lésions ou 'wound healing' est un phénomène complexe qui s'effectue par étapes. Le modèle généralement accepté est basé sur la guérison des plaies cutanées, un modèle qualifié «d'idéal» (Ross and Vogel 1978). Nous verrons plus loin qu'il faudra apporter des distinctions selon le type de lésion et son site, en particulier pour ce qui est des lésions sous-chondrales (Shapiro, Koide et al. 1993; Chevrier,

Hoemann, Sun and Buschmann 2006). Reste que les études démontrent que le processus est assez semblable et qu'il recouvre un ensemble prévisible de réactions concernant la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose de diverses cellules au niveau de la plaie. En bref, les étapes de la guérison des lésions de tissu vascularisé sont, dans l'ordre chronologique : 1) la coagulation; 2) l'inflammation; 3) la formation du tissu de granulation ou phase proliférative; 4) le remodelage de la matrice et la cicatrisation. La réépithélialisation est une étape qui fait aussi partie de ce modèle et qui débute assez rapidement, mais elle est très spécifique au paradigme cutané, et il n'en sera donc pas question ici. Chaque étape se caractérise par la mobilisation d'un type cellulaire dominant, mais les étapes se suivent en continuum et elles se chevauchent dans le temps, tant en ce qui est des cellules sollicitées que de la composition du tissu environnant.

Formation du thrombus hémostatique

La réaction immédiate à la perte d'intégrité d'un tissu est la coagulation vasculaire, surtout caractérisée par l'agrégation des plaquettes. L'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales du vaisseau brisé est une des premières étapes de la thrombose; elle est rendue possible du fait que les protéines de la membrane basale auxquelles adhèrent les plaquettes - collagène type IV, V, VI, fibronectine, laminine, facteur von Willebrand ... - ne sont normalement pas accessibles et qu'ils ne sont exposés que lorsque l'endothélium est endommagé. Avec l'adhésion, l'agrégation et la dégranulation des plaquettes dans le caillot, une multitude de médiateurs chimiques et de cytokines sont relâchés, comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le

facteur de croissance transformant bêta (TGF β), le facteur de croissance fibroblastique (bFGF) et bien d'autres encore (Pierce, Tarpley, Yanagihara, Mustoe, Fox and Thomason 1992). Le facteur de vascularisation endothéliale (VEGF), responsable en partie d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, est alors relâché, ce qui permettra l'exsudation de protéines du sang et la formation d'un conduit solide supportant la migration de cellules du sang vers la lésion. Ce conduit nommé matrice provisoire est principalement composé de fibrine. La cascade de coagulation qui se termine par la transformation du fibrinogène soluble en réseau de fibrine, par le biais de la thrombine, dépassent le cadre de cette recherche ; nous renvoyons le lecteur qui voudrait connaître les détails à R. A. Clark (Clark 2001).

Inflammation

Les premières cellules sanguines à arriver au site de la lésion sont principalement des neutrophiles, qui répondent aux facteurs chimiotactiques relâchés par les plaquettes comme le TGF β (plusieurs isoformes) (Deuel, Senior, Huang and Griffin 1982). TGF β 1 est un des isoformes les plus importants du processus de guérison. Sécrété sur le site par les cellules, il est synthétisé sous forme inactive et il peut être activé par différents mécanismes (Ross, Glomset, Kariya and Harker 1974) qui assurent sa présence au site de la lésion pendant tout le processus ((Kohler and Lipton 1974). Le TGF β joue plusieurs rôles, notamment dans l'attraction des neutrophiles et des monocytes. La principale fonction des neutrophiles est de nettoyer la plaie des agents contaminants par phagocytose et autres mécanismes spécialisés comme les radicaux libres d'oxygène.

Certains facteurs chimiotactiques facilitent aussi la transmigration des neutrophiles à travers l'endothélium en améliorant leur adhérence à l'endothélium et en stimulant la synthèse d'enzymes dégradantes (Albelda and Buck 1990). Les plaquettes de glycoprotéines telles la fibronectine, la thrombospondine et la vitronectine se déposent sur le réseau de fibrine, ce qui fait de la matrice provisoire un milieu particulièrement propice à la migration des cellules et favorable au recrutement ultérieur d'autres cellules.

Les monocytes sont recrutés au site inflammatoire par les médiateurs chimiques de l'inflammation et par les produits de dégradation des bactéries. Ils constituent le type cellulaire prédominant de la phase inflammatoire avancée qui survient de 6 à 8 heures après la lésion. Les agents chimiotactiques des monocytes incluent la protéine C5a, le collagène (Postlethwaite and Kang 1976) et la fibronectine (Clark 1988). Les macrophages sont essentiels au processus de guérison. Les études phares sur ce sujet ont démontré que, dans un animal où il y avait peu de macrophages, les étapes subséquentes de prolifération fibroblastique et de remodelage étaient sérieusement compromises, alors que l'absence de neutrophiles n'avait pas de conséquences aussi graves (Simpson and Ross 1972). Les macrophages sont une source importante de cytokines et de facteurs de croissance comme le TGF β , le PDGF et le EGF, qui jouent tous un rôle sur l'attraction de cellules comme les fibroblastes et les cellules endothéliales, ainsi que sur leurs fonctions réparatrices (Werner and Grose 2003).

Tissu de granulation

La relâche de ces facteurs et l'arrivée des fibroblastes, dès le jour trois et plus ou moins jusqu'au jour trente, annoncent la phase de la synthèse du tissu de granulation. Celle-ci se caractérise par la prolifération de fibroblastes et de cellules endothéliales, les premières synthétisant et déposant la matrice de remplacement, les secondes induisant l'angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux capillaires à partir de vaisseaux existants) qui donne au tissu son aspect granuleux. Sous le contrôle de facteurs comme le VEGF et le bFGF, les cellules endothéliales émigrent, prolifèrent et procèdent à la néovascularisation (Sasahara, Hayase, Yang, Iihara, Amano and Hazama 1995). Les fibroblastes sont à leur tour attirés par PDGF et TGF β , mais aussi par des éléments solubles de la matrice extracellulaire comme le collagène 1 et la fibronectine (Postlethwaite, Seyer and Kang 1978; Grinnell 1984), des protéines qui sont elles-mêmes synthétisées par les fibroblastes sous l'action du PDGF et TGF β (Souza, Sedlackova, Kuliszewski, Wang, Liu, Tseu, Liu, Tanswell and Post 1994).

L'addition de PDGF exogène sur la plaie accroît la présence de fibroblastes et stimule la synthèse de collagène, ce qui illustre la polyvalence de ces molécules (Pierce, Tarpley, Allman, Goode, Serdar, Morris, Mustoe and Vande Berg 1994). La migration des fibroblastes nécessite une matrice conductive solide. Elle obéit à un mécanisme différent de celle des leucocytes; la structure et la composition de la matrice sont donc cruciales. Les cellules fibroblastiques, tout comme les CSM dont nous parlerons plus tard, doivent pouvoir s'attacher solidement à la matrice afin d'exercer une traction et de

lancer un mouvement, alors que les leucocytes forment seulement de petites adhésions microscopiques sans tisser des câbles de stress d'actine (Ridley, Schwartz, Burridge, Firtel, Ginsberg, Borisy, Parsons and Horwitz 2003).

Les études *in vitro* montrent que les cellules fibroblastiques sont des cellules lentes qui migrent en «rampant» alors que les neutrophiles migrent rapidement par un mécanisme amiboïde (Affolter and Weijer 2005). Des protéines comme la fibronectine, le collagène et la vitronectine, permettent aux fibroblastes de bien adhérer à la matrice par le biais de récepteurs transmembranaires appelés intégrines. Un lien très étroit unit fibroblastes et matrice : les fibroblastes peuvent changer l'organisation et la composition de la matrice par néosynthèse et dégradation. Par des signaux en boucle rétroactive, la matrice influe à son tour sur différents comportements des fibroblastes comme la migration, la différenciation et la synthèse de la matrice (Clark 1993).

Remodelage

Grâce à la vascularisation accrue de la matrice, les fibroblastes présents restent en place pour amorcer la phase finale du remodelage et de la cicatrisation, laquelle se caractérise par une dégradation de la matrice existante et par le dépôt d'une matrice riche en collagène et protéoglycanes. Finalement, les fibroblastes en contact avec la matrice, influencés par des cytokines comme le FGF, PDGF et TGF β , contractent le tissu. La maturation de la cicatrice préside à la formation d'un tissu doté d'une plus grande force mécanique en tension mais, tout comme le cartilage, ses propriétés restent inférieures à

celle du tissu d'origine.

On peut conclure que la distribution spatio-temporelle des cellules au site de la lésion est régulée en grande partie par des médiateurs chimiques tels que des facteurs de croissance mais aussi par la composition de la matrice. On peut aussi comprendre pourquoi les blessures sous-chondrales auxquelles nous avons fait allusion se réparent mieux grâce à un meilleur apport sanguin. Il convient de rappeler que les connaissances sur les effets chimiotactiques des cellules de la guérison des plaies proviennent surtout d'études *in vitro* semblables à celle que j'ai utilisée pour cette thèse. Ces méthodes *in vitro* ont été appliquées à l'identification de nouveaux composants chimiotactiques des CSM mais aussi, dans un premier temps, pour l'étude de la migration 3D de ces cellules. La prochaine section aborde un aspect de la guérison des lésions du cartilage lorsqu'un saignement est induit et les différences qui apparaissent par rapport au paradigme cutané.

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

Propriétés et rôles

L'idée d'améliorer la guérison du cartilage en provoquant un saignement par stimulation de la moelle osseuse est née dans les années mille neuf cent cinquante (Pridie and Mc 1958). Par cette technique chirurgicale maintenant arthroscopique, des canaux sont pratiqués dans l'interface os-cartilage, entraînant un saignement de l'os vers le cartilage, ce qui améliore la réparation des défauts focaux (Newman 1998; Buckwalter and Mankin 1998b). Bien que l'hypothèse voulant que les CSM soient présentes dans les

lésions sous-chondrales ait été posée assez tôt (Furukawa, Eyre, Koide and Glimcher 1980; Friedman, Berasi, Fox, Del Pizzo, Snyder and Ferkel 1984), c'est à partir des études histologiques et biochimiques des lésions traitées par saignement induit que l'on a identifié la présence des CSM et reconnu qu'elles jouaient un rôle essentiel dans la réparation (Shapiro, Koide et al. 1993), ce qui démarque le processus par rapport au paradigme cutané. Mis à part leur rôle dans la guérison des lésions qui pénètrent l'os sous-chondral, les CSM ont pour fonction de lancer les signaux et les indices biochimiques nécessaires au développement à l'intérieur de la moelle des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des précurseurs des cellules sanguines (Choong, Tan, Luo and Lodish 2003).

Les CSM ont été identifiées pour la première fois par Friedenstein et al. (Friedenstein, Chailakhjan and Lalykina 1970; Friedenstein, Deriglasova, Kulagina, Panasuk, Rudakowa, Luria and Ruadkow 1974), qui ont reconnu à partir d'un extrait de moelle osseuse un type cellulaire adhérent, fibroblastique et formant des colonies en culture, qu'ils ont baptisé BMSC (acronyme pour *Bone Marrow Stromal Cells*). En implantant ces cellules dans une chambre de diffusion sous-cutanée, ces chercheurs ont pu observer la formation ectopique d'un tissu cartilagineux et osseux. Depuis lors, plusieurs travaux ont démontré la capacité de ces cellules à se différencier, dans des conditions de culture contrôlées, en plusieurs formes de cellules du type musculosquelettique, notamment en ostéoblastes et en chondrocytes, cellules anaboliques respectivement de l'os et du cartilage, mais aussi en adipocytes, en

fibroblastes et en myocytes (Caplan 1991; Prockop 1997; Pittenger, Mackay, Beck, Jaiswal, Douglas, Mosca, Moorman, Simonetti, Craig and Marshak 1999). La chondrogénèse des CSM peut être induite *in vitro* de plusieurs façons, comme en ajoutant au milieu de culture des cytokines comme les TGF β et les BMP (acronyme de *Bone Morphogenic Protein*) combiné ou pas à une culture de type «pellet», ou la tension en oxygène est diminuée (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg and Yoo 1998; Pittenger, Mackay et al. 1999; Solchaga, Dennis, Goldberg and Caplan 1999; Wang, Lou, Ju, Xia and Xia 2003). Les facteurs mécaniques peuvent aussi influencer sur la chondrogénèse des MSC (O'Driscoll, Keeley and Salter 1988; Wakitani, Goto, Pineda, Young, Mansour, Caplan and Goldberg 1994; Angele, Yoo, Smith, Mansour, Jepsen, Nerlich and Johnstone 2003; Huang, Reuben, D'Ippolito, Schiller and Cheung 2004) comme pour les cellules des bourgeons embryonnaires (Takahashi, Nuckolls, Takahashi, Tanaka, Semba, Dashner, Shum and Slavkin 1998). Il est intéressant de noter que l'étude de la formation *in vitro* de cartilage par les CSM aboutit à un système simplifié qui permet d'élucider les mécanismes complexes de la chondrogénèse lors du développement embryonnaire (Sekiya, Vuoristo, Larson and Prockop 2002).

Certaines études suggèrent qu'une sous- population cellulaire totipotente, - ayant un potentiel de se différencier en n'importe quelle cellule (Jiang, Jahagirdar, Reinhardt, Schwartz, Keene, Ortiz-Gonzalez, Reyes, Lenvik, Lund, Blackstad, Du, Aldrich, Lisberg, Low, Largaespada and Verfaillie 2002) - pourrait aussi être présente. Pour ceux qui cherchent à élaborer de nouvelles stratégies de régénération, la présence de ces

cellules chez l'adulte est encourageante et excitante, surtout dans un contexte où l'utilisation des cellules embryonnaires est strictement réglementée. Mais ces résultats sont encore controversés tandis que l'origine et la plasticité de ces cellules ne font pas l'unanimité. Par contre, il est généralement accepté que, parmi les cellules stromales de la moelle, il existe une population de cellules capables de se différencier en type mésenchymateux. Étant donné qu'on ne possède pas encore de marqueur qui permettrait une isolation prospective de ce sous-type cellulaire, le terme CSM est souvent employé pour désigner la population initiale de cellules et leur progéniture, connu sous l'acronyme BMSC (Le Blanc and Pittenger 2005) .

Ces dernières années, grâce à une panoplie de marqueurs - qui ne font d'ailleurs pas tous l'unanimité - les CSM ont été isolées ou identifiées dans plusieurs autres tissus adultes, comme les tissus adipeux (Gronthos, Franklin, Leddy, Robey, Storms and Gimple 2001) les cordons ombilicaux (Romanov, Svintsitskaya and Smirnov 2003), le synovium (De Bari, Dell'Accio, Tylzanowski and Luyten 2001) et aussi dans le sang (Kuznetsov, Mankani, Gronthos, Satomura, Bianco and Robey 2001; Khosla and Eghbali-Fatourehchi 2006). La présence de CSM dans la circulation sanguine a ouvert la voie à bien des spéculations sur leur rôle dans la guérison de tissus à des sites distants de la moelle osseuse (Opalenik and Davidson 2005). L'identité exacte des cellules en circulation, leur origine et leur capacité à être mobilisées par une lésion distante restent encore à déterminer (Javazon, Beggs and Flake 2004). Pour les sites de lésion distants de la moelle, les études suggèrent que les effets bénéfiques de ces cellules sont dus à deux

mécanismes (Le Blanc and Pittenger 2005). Selon le premier, les CSM seraient une source de remplacement des cellules différenciées sénescents ou qui auraient succombé à une blessure (Caplan 2005). Dans ce cas, les CSM se différencieraient en un type cellulaire correspondant aux cellules présentes au site de la lésion. Les CSM pourraient reprendre ainsi les fonctions initiales du tissu par un phénomène qui ressemblerait au développement embryonnaire du tissu. Selon le second mécanisme, les effets bénéfiques seraient indirects et dus à la relâche par les CSM de cytokines et de facteurs de croissance (Javazon, Beggs et al. 2004; Kim, Yoo, Choi, Choi, Choi, Yang, Yang, Im, Kim, Jung, Sung and Koo 2005) Ces agents chimiques provoqueraient la prolifération et la différenciation d'autres cellules comme les cellules endothéliales qui favoriseraient l'angiogénèse (Le Blanc and Pittenger 2005). Le rôle physiologique des CSM dans l'entretien et la réparation des tissus périphériques reste encore obscur. Les progrès passeront nécessairement par la mise au point de techniques *in vivo* d'analyse et de monitoring fiables. La plupart des observations proviennent de modèles animaux où les CSM ont été transplantées.

Applications en médecine régénérative

Indépendamment des contradictions et désaccords sur les fonctions des CSM chez l'adulte, leur capacité de se différencier en cellules de tissu conjonctif, de sécréter des cytokines et de proliférer *in vitro* en ont fait des candidats de choix pour les techniques de médecine régénérative du cartilage, mais aussi de plusieurs autres tissus de type mésenchymateux ou non (Prockop 1997; Caplan 2005). Inspirées par les hypothèses

sur leur rôle physiologique, les techniques de transplantation de CSM ont connu un essor fulgurant. Le génie tissulaire où l'on incorpore des cellules à des plates-formes 3-D de biomatériau propose une multitude de systèmes différents (Caplan 2005), et, malgré les succès cliniques mitigés, beaucoup sont convaincus de tenir là la solution d'avenir. Les techniques initiales utilisaient les chondrocytes, mais les CSM sont aujourd'hui les cellules les plus prometteuses et donc les plus utilisées.

A cette date, les applications qui ont eu le plus de succès concernent les fractures non-liées des os (Javazon, Beggs et al. 2004), et dans une moindre mesure, les lésions du cartilage (Caplan 2005). Pour les os, les plates-formes de transplantation sont souvent composées de biocéramiques poreuses à base d'hydroxyapatite/tricalcium phosphate (Tsuchida, Hashimoto, Crawford, Manske and Lou 2003) et de polymères pour le cartilage, comme le chitosan, l'acide hyaluronique, l'agarose, le collagène et plusieurs autres (Wakitani, Goto, Young, Mansour, Goldberg and Caplan 1998) (Solchaga, Dennis et al. 1999; Huang, Goh, Hutmacher and Lee 2002; Hunziker 2002). Ces plates-formes permettent de retenir les CSM au site des lésions et elles peuvent aussi faciliter la différenciation dans le sens désiré selon le tissu. Quand il s'agit du cartilage, les grands défis viennent de la difficulté d'assurer la rétention au site de la lésion et du fait que les implants n'épousent pas spontanément la forme du défaut dans le cartilage. Une technique prometteuse consiste à utiliser des hydrogels thermosensibles ou photosensibles, qui remplissent les défauts avant de se polymériser (Williams, Kim, Taboas, Malik, Manson and Elisseff 2003; Cho, Kim, Park, Jung, Yang, Han, Noh and

Lee 2004; Dang, Sun, Shin-Ya, Sieber, Kostuik and Leong 2006).

Ces techniques cellulaires ont un grand potentiel mais elles ne vont pas sans de nombreuses difficultés techniques résultant du manque de reproductibilité et des variations de résultat. De surcroît, la lourdeur administrative du processus d'acceptation de ces méthodes par les instances gouvernementales contribue aussi à rendre ces techniques difficilement applicables au niveau clinique, ce qui ne ralentit pas pour autant la demande de brevets sur cette technologie. Une voie de contournement du problème consisterait à développer des matrices ou des implants bio-intelligents capables d'induire le recrutement, la prolifération et la différenciation contrôlée des CSM de l'organisme aux sites pertinents. Dans cette approche, des systèmes de livraison contrôlée se combinent à des plates-formes de biomatériau bio-instructif tapissé de protéines de la matrice extracellulaire (Alsberg, von Recum and Mahoney 2006). Récemment, une technique de production de biomatériau hybride, développée par Biosyntech, a obtenu d'excellents résultats en terme de guérison de lésions focales du cartilage dans plusieurs espèces animales. Cette technique consiste à appliquer un mélange de sang et de chitosan au site de la lésion où la moelle est stimulée (Hoemann, Hurtig, Rossomacha, Sun, Chevrier, Shive and Buschmann 2005). Le potentiel recruteur de ce système sur les CSM reste encore à établir, mais les analyses histologiques laissent à penser qu'il pourrait y en avoir un. Les influences du biomatériau sur le phénotype de ces cellules restent aussi à déterminer.

Comme les études *in vivo* pour déterminer l'efficacité de ces stratégies sont

coûteuses et longues, les essais empiriques sont proscrits, et il est donc essentiel de comprendre au niveau fondamental, par les tests *in vitro*, les mécanismes et les facteurs sous-jacents à une bonne distribution cellulaire (Silva and Mooney 2004).

Migration cellulaire

Comme nous avons vu, la migration cellulaire est un processus essentiel de la guérison de plaie. La migration cellulaire est en fait un mécanisme essentiel dès les premiers jours de l'embryogenèse pour la morphogénèse et la croissance, jusqu'à l'âge adulte, non seulement pour la guérison de plaie, mais aussi dans la réponse immunitaire. La mobilité de cellules est aussi centrale à certaines pathologies graves comme l'invasion de cellules cancéreuses, les métastases, et l'inflammation chronique. Dans le cadre de secteurs émergents en génie biomédical comme la médecine régénérative, qui met l'accent sur le développement d'implants biofonctionnels avec ou sans cellules transplantées, dans le but d'obtenir une distribution contrôlée de certaines cellules, la compréhension des mécanismes de la migration cellulaire est essentielle (Silva and Mooney 2004). C'est dans cette optique que les derniers articles sont présentés. La prochaine section traitera des mécanismes sous-jacents à la migration cellulaire.

Cytosquelette

Nous verrons ici brièvement les structures intracellulaires sous-jacentes à la migration des cellules, le cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau de fibres intracellulaires que l'on retrouve dans toutes cellules eucaryotes. Il est constitué de trois

grandes familles de protéines: les filaments épais de tubuline ou microtubules (25 nm diamètre), les filaments fins d'actine ou microfilaments (9 nm) et les filaments intermédiaires, de diamètre intermédiaire. Les deux premières familles sont très homogènes et conservées. Les filaments intermédiaires sont en revanche plus hétérogènes, constitués de molécules histo-spécifiques. La vimentine est la composante majeure des cellules fibroblastiques et des CSM (Helfand, Chang and Goldman 2004).

De composition et de fonction très différentes, les filaments du cytosquelette ont des propriétés communes et sont constitués d'une charpente protéique fibrillaire formée par la polymérisation d'une ou de deux protéines apparentées, stabilisée par une multitude de protéines annexes (Baschong, Duerrenberger, Mandinova and Suetterlin 1999). Ces filaments sont dynamiques, et les protéines constitutives peuvent exister sous deux formes dans la cellule : monomériques, solubles et dispersées dans le cytoplasme ou insolubles et organisées en filaments. La régulation de leur polymérisation est sous le contrôle de nombreuses molécules effectrices et régulatrices (Small, Kaverina, Krylyshkina and Rottner 1999). La migration cellulaire dépend essentiellement de l'actine, qui est elle-même modulée et guidée par les microtubules (Waterman-Storer and Salmon 1999). Avant cette découverte, ces derniers étaient surtout connus pour leur rôle dans la division cellulaire. Le chapitre 6 abordera le cytosquelette en détails.

Types de migration dirigée

La migration cellulaire peut être guidée dans une direction précise par trois

mécanismes : le chimiotactisme, l'haptotaxisme et le guidage de contact (contact guidance). Le chimiotactisme est le mouvement de cellules vers le gradient chimique d'un agent attractant soluble (chimiotactique), comme les cytokines dont nous avons parlées à la section précédente (Zigmond and Hirsch 1973). Certains agents peuvent aussi induire une migration accrue des cellules indépendantes d'un gradient, dans une direction aléatoire, que l'on nomme chimiokinèse. Dans le cas du chimiotaxisme, il a été démontré dans des chambres spécialisées (Zigmond 1977) que les cellules s'orientent vers la source du gradient par l'extension de leur membrane plasmique et qu'une distribution asymétrique des récepteurs à l'agent chimique peut être détectée à la membrane des cellules (Firtel and Chung 2000).

L'effet des cytokines est transmis par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques qui peuvent être classés en cinq familles (Rossi and Zlotnik 2000) 1) récepteurs de l'IL-1, 2) récepteurs de la famille des hématopoïétines, 3) récepteurs de la famille du TNF, 4) récepteurs de l'interféron et 5) récepteurs des chimiokines. Ces derniers sont des récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés à des protéines G (famille des *ras* et phosphoinositol). Ils sont principalement responsables de la capacité des cellules à détecter et suivre un gradient chimique (Firtel and Chung 2000). Le chimotactisme est souvent utilisé en génie tissulaire, incorporant des techniques de livraison contrôlée d'agents chimiotactiques afin d'induire la migration et le recrutement des cellules à un site donné (Ramoshebi, Matsaba, Teare, Renton, Patton and Ripamonti 2002). Le chimiotactisme sera abordé aux chapitres 6 et 7.

Les agents insolubles, liés à un substrat comme la matrice extracellulaire, peuvent aussi guider la migration par un mécanisme nommé haptotaxisme. Dans ce cas, les cellules migrent dans la direction d'un gradient insoluble présent à la surface d'un substrat. L'amorce du mouvement ou la protrusion initiale n'est pas directionnelle comme dans le chimiotactisme, mais bien aléatoire, et c'est la présence accrue de l'agent insoluble lié au substrat qui favorise l'extension cellulaire dans une direction et, par incréments, le déplacement le long de ce gradient (Thiery 1984). Il est difficile d'imaginer que la distribution de protéines de la matrice extracellulaire puisse être aussi bien contrôlée dans un tissu vivant, mais le mécanisme est par contre utilisé *in vitro* pour diriger la croissance axonale de neurones (Hammarback, McCarthy, Palm, Furcht and Letourneau 1988; Dertinger, Jiang, Li, Murthy and Whitesides 2002; Yu and Shoichet 2005) et l'angiogénèse (Dike, Chen, Mrksich, Tien, Whitesides and Ingber 1999). Ceci laisse entendre que le revêtement de biomatériaux avec des motifs de protéines adhésives peut être un outil utile pour la confection de plates-formes (scaffold) en génie tissulaire car il permet d'obtenir une distribution optimale des cellules transplantées, les CSM par exemple. Cet aspect est également abordé au chapitre 7.

Le dernier mécanisme qui permet une migration dirigée est le guidage de contact qui exploite l'influence de la topographie 3D du substrat pour aligner les cellules. Ce mécanisme qui s'apparente probablement à l'haptotaxisme tient compte de la géométrie tridimensionnelle du substrat (McCarthy 1996).

Processus cyclique de la migration cellulaire

Le mouvement cellulaire est un processus dynamique et cyclique mettant en cause l'action concertée des molécules d'adhésion moléculaire, du cytosquelette et d'une panoplie de régulateurs et médiateurs moléculaires. Lauffenburger et Horwitz (Lauffenburger and Horwitz 1996) ont proposé la première vision intégrée de la migration en divisant celle-ci en quatre étapes bien définies. Chaque étapes est régulée spatio-temporellement par des facteurs externes comme la MEC et les cytokines, comme nous l'avons vu ci-dessus, et par des facteurs internes de transduction de signaux (Horwitz and Parsons 1999; Parent and Devreotes 1999; Horwitz and Webb 2003; Ridley, Schwartz et al. 2003; Van Haastert and Devreotes 2004; Vicente-Manzanares, Webb and Horwitz 2005).

1- Polarisation cellulaire. Le cycle s'amorce quand des signaux externes, comme les molécules chimiotactiques, sont captés et communiqués à l'intérieur de la cellule par des récepteurs spécialisés de la membrane cellulaire (Firtel and Chung 2000). Les cellules adoptent donc une morphologie polarisée dans l'axe du gradient chimique. Chez les neutrophiles et le dictyostelium, on observe une distribution polarisée des récepteurs et autres appareils cellulaires dans la direction de migration (Firtel and Chung 2000).

2- Formation des protrusions. En réponse aux signaux chimiotactiques, l'actine se polymérise afin d'étendre des protrusions dans une direction. Apparaissent alors les lamellipodes et les filipodes qui explorent le terrain dans la direction du gradient. Les

lamellipodes sont des structures d'actine aplaties et larges de forme lamellaire alors que les filipodes sont des projections minces et cylindriques en forme d'aiguilles. Une fois la direction bien établie, il y a mise en place de la mécanique du cytosquelette. Les mécanismes complexes par lesquels l'actine se polymérise pour former les protrusions dépassant le cadre de cet aperçu, je me contenterai de renvoyer le lecteur à Devreotes et Zigmond (Devreotes and Zigmond 1988), Stossel (Stossel 1989) et Divecha (Divecha and Irvine 1995).

3- Adhésion cellulaire. Formation des points focaux d'adhérence et des interactions cellule – MEC à l'avant au niveau des lamellipodes. Les intégrines se lient avec la MEC et s'oligomérisent. S'il s'agit de cellules mésenchymateuses, les intégrines recrutent les protéines de la plaque d'adhérence, les kinases et les protéines liant l'actine, pour former un complexe MEC-cytosquelette (Webb, Brown and Horwitz 2003).

4- Contraction de la cellule. Une fois la cellule ancrée, la myosine, molécule motrice, produit une force de contraction sur les fibres d'actomyosines polymérisées dans l'axe de migration, ce qui permet à la cellule d'avancer par traction dans le sens des protrusions (Conrad, Giuliano, Fisher, Collins, Matsudaira and Taylor 1993).

5- Rétraction cellulaire. La relâche des connexions adhésives à l'arrière de la cellule et la rétraction de la queue cellulaire termine le cycle. Les différentes composantes sont recyclées à l'avant de la cellule.

L'orchestration de ce processus complexe nécessite une régulation très précise

qui fait l'objet de plusieurs travaux où ont été élaborées des méthodes élégantes pour résoudre le casse-tête. Brièvement, les études pionnières de Hall et collègues (Diekmann, Abo, Johnston, Segal and Hall 1994; Hall 1994; Norman, Price, Ridley, Hall and Koffer 1994; Ridley and Hall 1994), à qui on doit le regain d'intérêt pour la migration, ont situé des membres de la sous-famille des protéines GTPase, comme cdc42, rac, et rho, parmi les régulateurs intracellulaires qui sont encore considérés comme la base du contrôle de la polymérisation de l'actine. Les recherches suggèrent que les filipodes sont surtout régulées par cdc42 (Hall 1994), alors que rac régule la formation des lamellipodes (Ridley, Paterson, Johnston, Diekmann and Hall 1992) et rho la formation des adhésions (Ridley and Hall 1992). En outre, les microtubules ont aussi été identifiés comme ayant un rôle majeur dans ce processus, particulièrement au niveau de la polarisation cellulaire, ou cdc42 serait actif dans la réorientation du centrosome, réorientation nécessaire pour établir une direction (Etienne-Manneville and Hall 2003).

La coordination spatiale et temporelle de l'attachement et du détachement cellulaire de la MEC forme la partie la plus importante de ce processus cyclique (Lauffenburger and Horwitz 1996). L'adhésion doit être finement contrôlée, c'est d'ailleurs pourquoi la composition matricielle joue un rôle majeur. Il a été démontré qu'une force d'adhésion intermédiaire entre la cellule et la MEC se traduit par une migration maximale (DiMilla, Stone, Quinn, Albelda and Lauffenburger 1993). Un substrat trop adhésif ne permet pas plus la migration qu'un substrat qui n'offre aucun lien d'ancrage aux cellules. La capacité des cellules d'adhérer à la MEC et de créer un lien

physique entre celles-ci et le cytosquelette intracellulaire se fait par l'intermédiaire des récepteurs spécialisés qui agissent sur des domaines spécifiques des protéines de la MEC.

Les récepteurs importants pour la migration des cellules mésenchymateuses sont les intégrines, récepteurs transmembranaires hétérodimères formés de 2 sous-unités alpha et bêta. Plus de quinze sous-unités alpha et huit bêta ont été identifiées et elles peuvent se combiner, de façon restrictive, pour former une grande panoplie de récepteurs spécifiques à un large spectre de ligands (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid 1999). Pendant la migration, le contact avec certaines protéines de la MEC provoque la formation des adhésions focales qui assurent la connexion entre la matrice et le cytosquelette (Webb, Brown et al. 2003). Les intégrines s'oligomérisent au niveau des protrusions cellulaires et recrutent par leur domaine intracellulaire les protéines qui formeront les complexes intracellulaires d'adhésion focale (DeMali, Wennerberg and Burridge 2003). On retrouve dans ces complexes des protéines phosphorylées, paxiline, taline, vinculine et FAK, et des complexes protéiques «adapteurs» comme Arp2/3 qui viennent compléter le lien entre les intégrines et les microfilaments d'actine. C'est à partir de cette connexion qu'une traction peut être exercée permettant à la cellule d'avancer. La connexion est aussi à l'origine de plusieurs phénomènes comme la mécanotransduction, intimement liée à la capacité des cellules à s'adapter à un environnement mécanique variable (Matthews, Overby, Mannix and Ingber 2006).

Les protéines de la matrice présentent plusieurs domaines capables d'interagir

avec les intégrines. La séquence RGD (tripeptide arginine-glycine-acide aspartique) a été identifiée comme un domaine essentiel, mais non unique, à la liaison cellule-matrice par les intégrines (Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Cette séquence est présente dans plusieurs protéines de la MEC, fibronectine, vitronectine, collagène type I, thrombospondine, tenascine et fibrinogène (Ruoslahti and Pierschbacher 1987).

CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, le premier volet de cette thèse, qui fait l'objet du premier article, s'intéresse aux effets des compressions mécaniques uniaxiales sur l'intégrité mécanique et biochimique de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. Même si des preuves circonstanciées convaincantes nous incitent à croire que des forces mécaniques sous forme de compressions pourraient affecter directement la molécule de collagène, les effets des forces mécaniques sur la structure du collagène n'ont jamais été étudiés auparavant (avant 2002), principalement à cause de limitations techniques. Ces deux éléments seront étudiés en parallèle dans le premier article intitulé : 'Cyclic Compression of Cartilage/Bone Explants In Vitro Leads to Physical Weakening, Mechanical Breakdown of Collagen and Release of Matrix Fragments'. L'objectif de cette première étude est de déterminer si les forces mécaniques engendrées lors de compressions non confinées de grande amplitude ont la capacité d'induire une dénaturation de la molécule de collagène.

L'hypothèse de départ, basée sur le comportement du tissu sous compression, stipule que les stimulations mécaniques en compressions uniaxiales non-confinées peuvent dénaturer la molécule de collagène. La stratégie utilisée dans cet article combine la culture *in vitro* d'explants cartilagineux qui sont comprimés à haute amplitude et testés mécaniquement, par un système de microtestage, et ensuite biochimiquement, avec des tests de dosage de la molécule de collagène dénaturé.

Le deuxième volet de la thèse étudie le comportement mobile des cellules souches de la moelle osseuse. La plupart des connaissances sur la migration que nous avons résumées dans le chapitre précédent ont été acquises par imagerie de cellules dans des tests *in vitro* en 2D, avec des systèmes comme la chambre Zigmond (Zigmond 1977) et sa version améliorée, la chambre Dunn (Zicha, Dunn and Brown 1991). Quant à eux, le test-sous agarose (Nelson, Quie and Simmons 1975) et la chambre Boyden (Boyden 1962) sont utilisés pour quantifier la réaction d'une population entière de cellules face à des agents chimiotactiques et ne conviennent pas à l'observation mécanistique de la migration (Tranquillo, Zigmond and Lauffenburger 1988). Des travaux récents tendent à démontrer que certains aspects de la migration pourraient varier selon le type d'environnement (Cukierman, Pankov, Stevens and Yamada 2001). Or, les techniques 3D existantes ne permettent pas une résolution élevée (Friedl, Zanker and Brocker 1998) et souvent, elles ne parviennent pas à induire une migration dans une direction prévue, ce qui constitue une des difficultés techniques associées à ce genre d'observation : l'absence de direction précise fait en sorte qu'il est très difficile de suivre les cellules et d'obtenir un foyer parfait à chaque image.

L'objectif de la deuxième étude est donc d'élaborer une technique pour l'observation de la migration de cellules en 3D. Nous posons l'hypothèse qu'une technique combinant les marquages fluorescents de quatre éléments cellulaires avec une observation confocale au microscope 3D de cellules migrant dans la chambre Boyden, pourrait apporter une solution susceptible d'égaliser les méthodes 2D quant à la qualité

des images.

Enfin, comme nous l'avons vu, il a été démontré que plusieurs protéines de la matrice peuvent stimuler une réaction migratoire chez plusieurs types cellulaires, mais le phénomène n'avait jamais été observé sur les CSM. Pourtant, la connaissance des facteurs environnementaux qui peuvent influencer sur la distribution de cellules est essentielle, non seulement pour l'élucidation des rôles physiologiques des CSM, mais aussi pour la conception de plates-formes biofonctionnelles ou bioinstrutrices.

L'objectif du dernier article de cette thèse est donc de vérifier si des protéines de la matrice telle que le collagène type I, la fibronectine et la vitronectine, dans leur forme soluble ou insoluble, interagissent avec les CSM et provoquent la migration dirigée de celles-ci. Nous stipulons que ces protéines peuvent induire la migration dirigée des CSM par deux mécanismes, soit l'haptotaxisme et le chimiotactisme.

CHAPITRE 3. DÉTAILS TECHNIQUES DE L'ÉTUDE SUR LES EFFETS DES COMPRESSIONS MÉCANIQUES SUR LES EXPLANTS DE CARTILAGE

Ce chapitre consiste en une revue des techniques principales utilisées dans l'étude des effets de compressions sur l'intégrité de la matrice extracellulaire (MEC) des explants de cartilage bovin. La méthode d'isolation et l'obtention d'explants de forme géométriquement contrôlée sera vue en premier lieu. Ensuite suivra une section sur les méthodes de compression *in vitro*. Les techniques de dosage des molécules de la matrice seront vues en dernier.

Disques de cartilage

Des disques cylindriques de cartilage/os de 4mm de diamètre, 1,5mm d'épaisseur (avec environ 0.5mm d'os) sont extraits par une mèche de biopsie de la surface articulaire d'une tête humérale de jeune bœuf âgé de 1 ou 2 ans. L'excédent d'os des cylindres cartilage/os extraits est ensuite ajusté avec une scie dentaire fixée sur un montage mobile afin d'obtenir des disques de 1.5mm d'épaisseur. Suite à plusieurs lavages sous la hotte dans un tampon salin physiologique (Hank's Buffer Saline Solution) contenant 100ug/ml de gentamycine, la condition de stérilité est atteinte et les disques sont mis en culture dans un milieu (pH 7.2) sans sérum et avec ascorbate (20 ug/ml), gentamycine 50ug/ml et 0.01% d'albumine sérique bovine (BSA) dans un

incubateur à 37C et à 5% CO₂. Les milieux sont changés à chaque jour et l'ascorbate est préparé frais à chaque jour. L'ascorbate est un cofacteur de l'enzyme responsable de l'hydroxylation des prolines sur la chaîne alpha du collagène, donc de l'assemblage des molécules. Cette procédure ainsi que la stabilité biologique de ces explants en culture est détaillée dans un article (Dumont, Ionescu, Reiner, Poole, Tran-Khanh, Hoemann, McKee and Buschmann 1999).

Chargement et propriétés mécaniques

Le protocole de chargement, soit les amplitudes, la durée, la vitesse et le nombre de cycles, a été déterminé de façon à représenter une situation excessive mais physiologique. Chaque groupe expérimental est chargé à 24hrs d'intervalle (1 groupe par jour), en commençant 24hrs suivant l'isolation. Les disques sont placés, un par un, dans du milieu de culture à l'intérieur d'une chambre stérile fixée sur un appareil de compression placé à l'intérieur d'un incubateur et soumis à des compressions cycliques uniaxiales non confinées. Les explants contrôles sont placés à côté des explants chargés dans la même chambre et le même milieu de culture. L'appareil utilisé est le système de testage micromécanique Mach-1 (Biosyntech, Laval, Qc), qui comprend un actionneur précis de déplacement, sur lequel est fixée la chambre stérile contenant les explants. Le déplacement s'effectue en direction uniaxiale de la tige de compression, qui est liée à la cellule de charge, qui enregistre les forces générées. Le logiciel Mach-1 Analysis permet à la fois de contrôler le système et d'enregistrer les données en continue. Les disques

sont ensuite soit immédiatement congelés (permettant une analyse biochimique simultanée de tous les explants) ou mis en culture pendant 10 jours selon leur groupe expérimental (congelé ou cultivé post-chargement).

Avant et après le protocole de chargement à haute amplitude, les propriétés mécaniques des explants sont analysées avec le même système mais par un protocole de relaxation de contraintes en compression uniaxiale non confinées. Les courbes de relaxation de contraintes sont ensuite ajustées au modèle analytique biphasique afin d'extraire les caractéristiques mécaniques du tissu. Ces valeurs sont ensuite comparées aux analyses biochimiques de la matrice afin d'analyser les relations potentielles entre les variations de propriétés mécaniques et biochimiques.

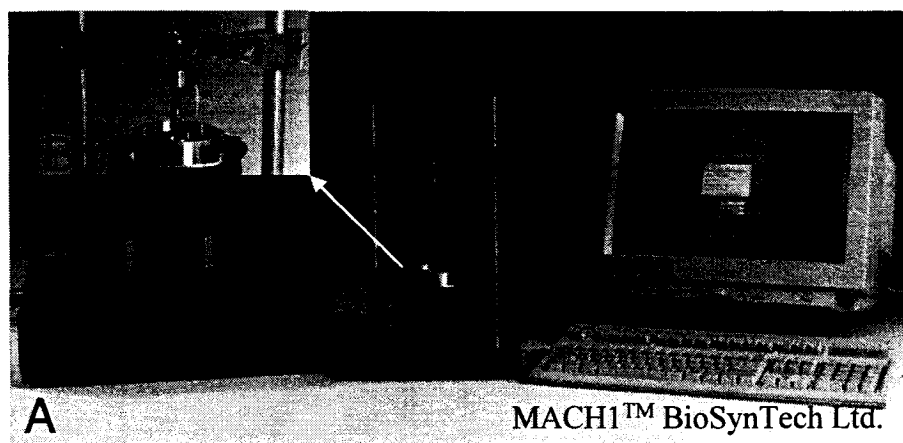


Figure 3.1. A. Système de compression *in vitro* de haute précision. B. Chambre de compression dynamique stérile

Extraction du contenu de collagène dénaturé et natif et des protéoglycanes des explants cartilagineux

L'extraction des deux éléments principaux du tissu cartilagineux se fait par une digestion successive de 24 heures avec deux enzymes. Dans un premier temps, le collagène dénaturé est sélectivement extrait des disques en l'incubant avec alphachymotrypsine, une serine protéase qui clive le collagène dénaturé, mais qui est incapable, comme la grande majorité des protéases humaines, de cliver le collagène natif (triple hélice). Cette enzyme clive spécifiquement au niveau des acides aminés hydrophobiques. Comme ceux-ci sont surtout situés dans la région interne hydrophobe de la triple hélice de collagène, seules les molécules de collagène non-hélicoidales (dénaturées) possèdent des sites exposés et susceptibles de clivage par cette enzyme. Cette enzyme est donc utilisée pour extraire sélectivement du tissu le collagène dénaturé in situ. Le collagène natif en triple hélice du cartilage est ensuite extrait par protéinase K à 56°C, une enzyme avec une large activité enzymatique. L'inhibition des enzymes d'alphachymotrypsine (ACT) et protéinase K (PK) se fait avec tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) et l'ébullition, respectivement.

Test ELISA : dosage du collagène dénaturé dans les extraits

Le contenu en collagène de chaque extraction est ensuite dosé par un test ELISA (acronyme de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), qui utilise la spécificité des anticorps pour détecter ou doser des protéines dans des liquides biologiques. Cette

méthode permet de déterminer le pourcentage de collagène de type II dénaturé dans les extraits enzymatiques de cartilage (Hollander, Heathfield, Webber, Iwata, Bourne, Rorabeck and Poole 1994). L'anticorps en question, le COL2-3/4m, est spécifique à un épitope (séquence d'acide aminé reconnue par un anticorps) de la chaîne alpha du collagène type II, nommé CB11b. Cet épitope est situé dans une région hydrophobe de la triple hélice de collagène et est exposé seulement lorsque la chaîne est déroulée (collagène dénaturé). On obtient les anticorps spécifiques au collagène dénaturé en présentant dans un lapin un peptide provenant de la dégradation par cyanogène bromide de la chaîne hélicoïdale de collagène. Le lapin produit alors les anticorps spécifiques à ce peptide CB11b de 23 acides aminés qui se retrouve uniquement dans le collagène dénaturé. Il est aussi évidemment résistant aux digestions de la plupart des enzymes, permettant d'être dosé après son extraction. Cet anticorps est ensuite purifié et utilisé pour la détection spécifique du peptide CB11b dans les extraits enzymatiques. Les épitopes CB11b qui sont détectés dans l'extrait d'alphachymotrypsin et protéase K sont considérés comme venant du collagène dénaturé et natif, respectivement.

Le type de test ELISA utilisé ici est du type 'inhibition' (Figure 3.2). Dans cette technique de dosage les puits d'une microplaque sont tapissés avec un antigène de capture capable de lier spécifiquement un anticorps. Lors de cette opération appelée tapissage (*coating*), l'antigène de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. Avec le test CB11b, du collagène dénaturé arborant l'antigène CB11b est utilisé comme antigène phase solide pour tapisser les plaques. La solution à tester est

ensuite incubée avec l'anticorps anti-CB11b, ce qui résulte en une diminution des anticorps capables de réagir avec l'antigène (Phase I d'inhibition). Une quantité fixe de ce mélange est ensuite transférée à la plaque tapissée de collagène dénaturé (phase II). Les anticorps qui ne sont pas liés vont donc se lier à la phase solide de cette plaque. Après un lavage, seuls les anticorps liés à la phase solide restent dans la plaque alors que ceux ayant formé des complexes avec l'échantillon sont éliminés. Un deuxième anticorps conjugué à l'alkaline phosphatase est ensuite dirigé contre les anticorps formant des complexes, qui s'ajoutent au complexe existant (phase III). On ajoute le substrat de l'enzyme créant une réaction colorimétrique, avec une intensité inversement proportionnelle à la quantité de CB11b dans notre échantillon. La réaction peut ainsi être quantifiée par spectrophotométrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène (peptide CB11b synthétique).

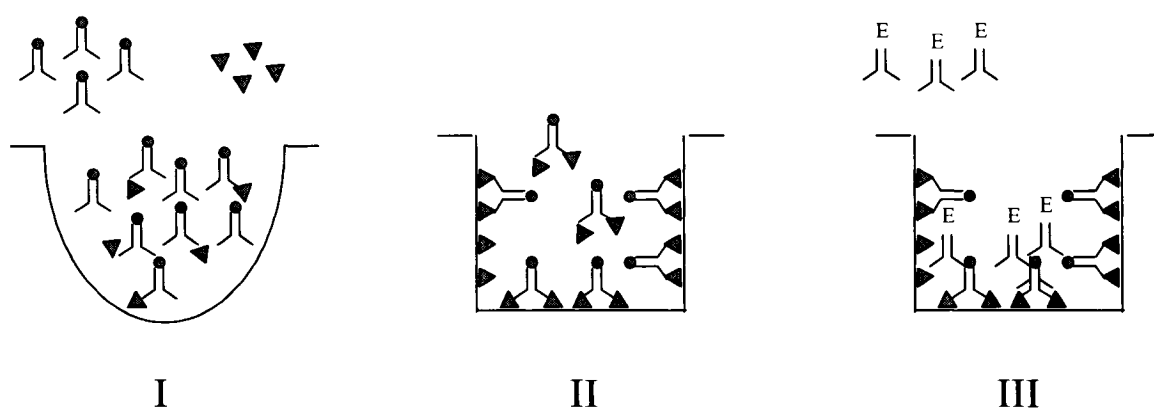


Fig. 3.2. Différentes phases de l'essai ELISA de type inhibition : Phase I : Pré-incubation de notre échantillon (triangles) avec les anticorps. Phase II : Un extrait du mélange en phase I est transféré dans la plaque tapissée de collagène dénaturé. Les anticorps avec

des sites libres se lient donc avec la phase solide. Phase III : Un anticorps secondaire conjugué avec l'alcaline phosphatase est ajouté.

Dosage des protéoglycanes

Les extractions enzymatiques du collagène digèrent aussi chacune une proportion des protéoglycanes. Le dosage total de ceux-ci doit donc se faire avec les deux extraits. Le contenu total dans les disques est dosé par un essai colorimétrique au DMB (bleu de diméthylméthylène). Taylor et Jeffree (Taylor and Jeffree 1969) ont premièrement introduit le 1,9-diméthylméthylène bleu pour la détection histologique de glycosaminoglycan sulfaté (GAG). Depuis quelques modifications par d'autres groupes, dont Farndale et al. (Farndale, Sayers and Barrett 1982 ; Farndale, Buttle and Barrett 1986), cette technique est grandement utilisée pour le dosage de GAG dans les extraits tissulaires. La réaction colorimétrique proportionnelle à la quantité de GAG est dosée par spectrophotométrie à 530 nm, à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues de GAG en solution.

Dosage du collagène clivé

Pour le collagène clivé enzymatiquement, un autre test Elisa (Billinghurst, Dahlberg et al. 1997) utilisant un anticorps spécifique au néoépitope formé lors du clivage par les collagénases 1,2 et 3 (MMP1, 8 et 13) est utilisé sur l'extraction d'alphachymotrypsin (le

collagène clivé se dénature et donc est extrait par alphachymotrypsine). Ceci permet de doser le collagène clivé parmi le dénaturé et ainsi refléter l'activité des collagénases et leurs implications dans la dégradation de collagène dans le disque. L'article démontre que ce n'est pas tout le collagène dénaturé qui est clivé enzymatiquement.

Détection par Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique qui permet la détection et l'observation d'antigènes spécifiques dans une coupe de tissu. L'anticorps décrit ci-haut qui détecte le collagène dénaturé est utilisé sur des coupes d'explants. Le tissu est en premier lieu fixé ou congelé afin de préserver sa structure physiologique. Des coupes minces ou cryosections sont ensuite faites avec un appareil spécialisé comme le microtome. Cet appareil effectue des coupes sur le tissu à -20 °C, et peut fournir des coupes aussi minces que quelques microns (6 µm dans notre cas). Les coupes sont ensuite perméabilisées (débarassées des protéoglycanes) de façon à permettre une bonne pénétration des anticorps et donc une détection efficace de l'antigène dans tout le volume de la section. Après des lavages, on détecte les anticorps primaires liés, qui démontrent la présence de collagène dénaturé, par un anticorps secondaire, un peu à la manière de la détection dans le test ELISA décrit ci-haut. Par contre, dans ce cas, l'anticorps secondaire est conjugué à une molécule fluorescente. Grâce au microscope à fluorescence avec une lampe au mercure et des filtres optiques, il est possible de visualiser uniquement les molécules fluorescentes, et donc d'obtenir une idée de la distribution du collagène dénaturé dans les

sections. Les principes d'immunofluorescence seront les mêmes dans l'article 2. Par contre, les éléments marqués seront des cellules en culture (immunocytochimie) et l'observation se fera au microscope confocal à balayage laser.

Cette approche ciblant les deux principales molécules du cartilage nous permettra de procéder à l'étude des effets de compressions cycliques non confinées à haute amplitude sur l'intégrité biochimique et mécanique du cartilage articulaire.

CHAPITRE 4. CYCLIC COMPRESSION OF CARTILAGE/BONE EXPLANTS IN VITRO LEADS TO PHYSICAL WEAKENING, MECHANICAL BREAKDOWN OF COLLAGEN AND RELEASE OF MATRIX FRAGMENTS

Abstract

Mechanical loading of articular cartilage can produce catabolic and anabolic changes in tissue metabolism. Most previous studies in this area have focussed on aggrecan. Little information concerning load-induced collagen modifications has been obtained. We have therefore conducted studies where mechanical loads are applied in vitro to full thickness cartilage explants retaining a thin layer of bone, in order to investigate mechanically-induced collagen breakdown and consequent turnover, in addition to aggrecan changes and mechanical property alterations. Tissue explant disks were subjected to unconfined compression and either immediately frozen or kept in static culture for 10 days. Mechanical tests of the disks immediately prior to and just after the cyclic loading period were also performed. They showed a weakening of the collagen network and an increased hydraulic permeability due to the cyclic loading. Load-induced alterations of the extracellular matrix was then clearly evidenced by an increase in denatured collagen in the disks frozen immediately after loading compared to unloaded controls. Loaded disks maintained in culture for 10 additional days following cyclic loading no longer expressed this increase in denatured collagen suggesting that mechanically denatured

collagen II had undergone a removal process which could represent turnover or repair, or the beginning of progressive degradation. Indeed matrix fragments of collagen II and glycosaminoglycans were found to be released to post-loading culture medium in increased quantities compared to unloaded controls. Our data further demonstrates the ability of mechanical load of articular cartilage to modulate turnover and metabolism of collagen and proteoglycan in a complex and multifactorial manner that may be of particular significance in the pathogenesis of osteoarthritis and in the development of pharmacological agents to modulate its progression.

Introduction

Articular cartilage in diarthrodial joint experiences complex load and deformation during locomotion and other physical activities. It exhibits unique mechanical properties enabling it to transmit load to subchondral bone while providing the joint with a nearly frictionless articulation, thus protecting it from potential mechanical wear and damage. These biomechanical functions are assured by the extracellular matrix (ECM) of cartilage, a reinforced poroelastic structure consisting of a tension-resistant fibrillar collagen network entrapping a dense proteoglycan (PG) gel of low permeability (30). The PG gel resists compression (10) and also accounts for the low permeability to fluid flow (15, 29). The collagen network provides force in tension, which at equilibrium counteracts the swelling pressure generated by the PG gel and limits tissue swelling. During dynamic loading the strong resistance of collagen to

extension dramatically increases tissue fluid pressurization (27) thereby creating high tissue stress during physiological loading.

Although mechanical stimulation is necessary for cartilage development and homeostasis (9, 11, 19, 24), abnormal loading has also been shown to initiate cartilage degradation (7, 18, 19, 23, 36,). Altered *in vivo* mechanical environments, such as surgically induced joint instability, provoke cartilage degradation (7, 39, 40) while *ex vivo* and *in vitro* mechanical loads can also alter the integrity of the ECM of articular cartilage to produce osteoarthritis-like changes (1, 6, 12, 18, 23, 34, 36). Osteoarthritic cartilage is mechanically different from normal cartilage, showing diminished stiffness, loss of tensile strength and increased tissue hydration and permeability, the latter considered a first sign of matrix disruption (5, 31). Such swelling is thought to result from a compromised collagen network that is unable to retain the osmotic pressure generated by the heavily charged proteoglycan gel (2,14). Osteoarthritic cartilage further exhibits increased levels of cleaved and denatured type II collagen, shown to result from excess collagenase activity (4, 21). Upregulated collagenase activity is also seen in the development of OA in ageing and unstable joints (38). Additional implication of collagen II in the etiopathogenesis of osteoarthritis (OA) is highlighted when the slow turnover of collagen in adult cartilage is considered (32), and in light of animal models of OA where tissue defects are induced by collagen II mutations (33).

Previous studies regarding load-mediated tissue degradation have focused on water content, ion-induced swelling, proteoglycan metabolism (18, 36) and/or

histological analysis of cartilage and bone (7, 18, 39), while few have provided data on possible direct collagen denaturation in situ due to load (12). Recently, a specific immunoassay for an intrachain epitope (CB11b) exposed only in denatured but not native type II collagen was developed to localize (22) and quantify (21) denatured type II collagen in cartilage. In the current study we have applied this collagen breakdown assay to precisely loaded cartilage/bone explants in order to investigate the ability of mechanical load to modulate collagen network integrity, turnover and functional mechanical properties as well as proteoglycan metabolism in this multidimensional study. Our main hypotheses was that mechanical load could compromise the integrity of the collagen network, render it less functional and possibly activate a series of collagen and proteoglycan related biochemical turnover events that are specific to mechanically loaded cartilage and not necessarily present in static cultures. The results suggest that mechanical load plays an intrinsic role in the homeostatic control of collagen metabolism that is important in normal physiology as well as in cartilage degeneration.

Methods

Isolation and Culture of Cartilage/Bone Explants

Full thickness 4mm diameter cartilage disks (n=60) retaining a thin layer of underlying bone were isolated from the shoulder joints of 1-2 year old skeletally mature steers 6-16 hours post-mortem, using a specialized apparatus described previously (13). The thickness of these disks was uniform at 1.50 ± 0.05 mm, with about 1.13 ± 0.13 mm

representing cartilage, the remainder being subchondral bone. Biopsy punches (15-33-33, Miltex, NY) were then used on one group of 20 disks to reduce their diameter from 4mm to 3mm. The disks were cultured at 37°C and 5% CO₂ in serum-free DME/F12 (D8900, Sigma) changed daily, supplemented with 50 µg/ml of gentamycin (G1272, Sigma), 0.01% of bovine serum albumin (A8412, Sigma) and 20 µg/ml of ascorbate (A4034, Sigma). Physiological and metabolic stability of this explant system has been demonstrated (13). Groups of 6 disks taken from adjacent anatomical locations within the load-bearing regions of three joints were randomly distributed into 3 experimental groups containing 10 matched pairs per group for a total of 60 disks. The matched pairs allowed one disk from each pair to serve as the unloaded control alongside the mechanically loaded disk, the two disks having similar (although not identical) properties due to their original adjacent locations in the joint. Cell viability on 2 additional pairs of loaded and unloaded 4mm samples was assessed using Molecular Probe's Calcein-AM (C-1430) for live cells and ethidium homodimer-1 (E-1169) for dead cells following previously described methods (13). In vitro loading began after a 2 day equilibration period in culture following tissue isolation. The first group of 20 disks (10 loaded, 10 controls) was subjected to cyclic loading (see below) on the third day after isolation; each of these disks was frozen immediately after the ~20 minute loading protocol by dipping disk-containing Eppendorf tube in liquid nitrogen. The second group of 20 disks was cyclically loaded on the 4th day after isolation in exactly the same manner as those loaded on the previous day except that they were placed in culture

medium changed daily as described above for 10 days after the loading period to observe consequent load-induced metabolic changes. The third group of 20 disks loaded on the 5th day after isolation were 3mm in diameter and were frozen immediately after loading as were those of 4mm diameter loaded two days previously described above.

Mechanical Characterization

Prior to cyclic loading of each of the 4mm disks on day 3, each disk was subjected to mechanical characterization using a sequence of stress relaxation steps in the same unconfined compression chamber used for the cyclic loading. Disks were transferred aseptically to the sterile stainless steel (316L) compression chamber containing 3.5ml of culture media at 37°C (Fig 1), and the chamber subsequently mounted inside an incubator onto a Mach1TM Mechanical Loading Unit (Biosyntech Ltd., Laval, Quebec, Canada), a high sensitivity mechanical testing and in vitro loading apparatus. Control disks were placed in a separate outer ring of the same chamber so that they experienced identical conditions as the loaded specimens, apart from the loading itself and any load-induced conditioning effect on the medium. Contact between the compression post and the samples was assured by attaining a tare load of 0.1 g followed by an additional 10 μ m compression. Then a sequence of 5 steps of 20 μ m amplitude and 5 μ m/s speed was applied to obtain a total displacement of 100 μ m corresponding to about 10% cartilage strain. Relaxation proceeded after each step until the change in load was less than 0.05 grams per minute, at which time equilibrium was considered to have been attained and the next step was applied. Once the last step was completed, the 100

μm compression was removed, the actuator returned to its initial offset. A five minute resting period in the chamber was then sufficient to allow reswelling and obtain contact with the compression post as indicated by the detected load. The disk was then loaded according to the cyclic loading protocol described below in the same culture media. Finally, after the cyclic loading a 20 minute rest period was allowed for the disk to regain its initial height by reswelling. By monitoring contact of the sample with the compression post, we found that disks reswelled to within $25\mu\text{m}$ of their initial height, that is, to approximately 98 % of their initial thickness. This is in contrast with studies showing increases in water content, hence disk swelling to greater than the initial thickness, after vigorous loading (12, 18). The lack of bone in those cartilage disks compared to ours with bone may partially explain the increased hydration seen in those studies. We then performed the same sequence of stress relaxation steps to mechanically characterize the disk after the cyclic loading. To minimize the influence of incomplete reswelling and uneven disk thickness ($\pm 25\mu\text{m}$), only the stress relaxation data from the fifth step (from 80 to 100 μm) were analyzed using a fibril-reinforced biphasic model (37) to determine values of hydraulic permeability (k), the equilibrium matrix modulus (E_m) and the fibril network modulus (E_f), both before and after loading. Cartilage thickness was approximated at 1.13 ± 0.13 mm for all disks based on the mean of microscopic observations and measurements of 10 disks performed in another study of our group using the same tissue system (26).

Cyclic Loading

For the 4mm diameter disks, one disk of each pair was loaded with 40 ramps of 250 μm amplitude at a velocity of 100 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Each ramp was followed by a 20 second relaxation for a total loading time of about 17 minutes per disk. Parameters of the loading protocol were chosen to achieve a high average tissue surface stress, between 2 and 5MPa that is considered physiological (16, 20) and did not exceed the load capacity of our system which was 10kg. Since the above loading parameters produced total loads on 4mm diameter disks which approached this 10kg maximum, we were obliged to reduce the disk diameter to 3mm, in order to achieve yet higher tissue stresses without exceeding the system load capacity. These 3mm disks were loaded with a similar protocol with an increased amplitude of 400 μm and speed of 250 $\mu\text{m}/\text{s}$ resulting in higher average tissue surface stresses, between 5 and 8 MPa. We have tried with this displacement-controlled ramp-release protocol to follow load patterns experienced by the lower limbs during locomotive activities, where a load free recovery, although much shorter, occurs as contact between opposing articular surface is lost between cycles (3). The rest period between cycles also minimized loss of volume of the explants between cycles, ensuring significant lateral expansion of the matrix for each cycle, and thereby the continued presence of tensile stress on the collagen network during the cyclic loading.

Total and Denatured Collagen in Disks and Media

A previously developed immunoassay for quantifying total and denatured collagen II in cartilage was applied (21). Disks are subjected to an initial incubation in α -chymotrypsin that extracts denatured type II collagen but not intact triple helical type II collagen (8). This is followed by proteinase K extraction of the remaining dominant native collagen fraction. Cartilage mass in the disks was obtained by subtracting the remaining bone mass in the proteinase K extracts from the total disk mass. In our study we did not apply a guanidine HCl extraction prior to α -chymotrypsin extraction as has sometimes been performed (2, 12) since we found quite elevated levels ($\sim 3\times$) of denatured collagen after GuHCl extraction compared to before GuHCl extraction, indicating GuHCl induced collagen denaturation. Swelling of collagen fibrils exposed to GuHCl have been seen using transmission electron microscopy of tendons (35). Furthermore, extraction in GuHCl to remove PG appeared unnecessary since more than 80% of the total disk PG was found in the α -chymotrypsin extract. Both extracts were then analyzed for collagen content using an inhibition ELISA with the antibody COL2-3/4m shown to react specifically with the CB11b epitope of the $\alpha 1$ chains of denatured type II collagen (21). The assay was also performed on the culture media for disks cultured after cyclic loading. In this case culture medium of wells from all disks ($n=10$) in the same group from two consecutive days of culture were pooled to a total volume of 5000 μl and boiled for ten minutes to inactivate any enzymes having diffused from the disks. A 14-fold concentration was then obtained using microcon concentrators (42407,

Amicon Canada, Ont) prior to detection by the CB11b ELISA assay.

Proteoglycan in Disks and Media

Proteoglycans, principally aggrecan, in 4mm diameter cartilage disks and released to post-loading and loading culture media was assayed as total glycosaminoglycan (GAG) content using the dimethylmethylene blue dye as described previously (13, 17). For total GAG content in disks α -chymotrypsin and proteinase K extracts were both analysed and added together.

Immunohistochemical Detection of Denatured Collagen

Explants were immediately “flash frozen” in liquid nitrogen after loading until sectioned. Tissue disks, including underlying bone, were mounted in OCT embedding media (Miles laboratory), frozen, and 6 μ m sections were cut at -20°C. Cryosections were then enzymatically permeabilized according to Hollander and al. (22) with the addition of keratanase (100810-1//SK100810-1, Chromatographic Specialties, Ont) at 400mU/ml to the permeabilization step. Subsequent washes and antibody probing were also as described previously (25, 22) with slight changes in the protocol. Briefly, washed and BSA (1%) blocked sections were probed with monoclonal mouse COL2-3/4m antibody diluted 1:20 in PBS/0.1%BSA, or with non-immune buffer (PBS/0.1%BSA) as a negative control. Following three 5 minutes washes in PBS/0.1%BSA, the mouse COL2-3/4m antibody-treated sections were incubated for an hour at 37°C with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to the fluorescent agent ALEXA (A11001,

Molecular Probes, OR) diluted 1:200 in PBS/0.1%BSA. Final washes, a GOC anti-fading treatment, MOWIOL slice mounting and image acquisition were done as described in Langelier et al. (25).

Statistical Analysis

Quantitative results such as total and denatured collagen, GAG, and mechanical properties are presented as mean \pm standard deviation, for each experimental group (N=10). Comparative analysis between control and loaded samples were based on a two tailed paired Student's T-test, with $p < 0.05$ considered statistically significant. Results are normalized to cartilage wet weight. Data presented here concerning load-induced collagen denaturation are representative of 5 similar experiments using similar methodology, the most extensive experiment being described here. Qualitative data analysis of viability and immunohistochemical staining are based on a single observer of at least 6 sections of 2 samples from each group and are also representative of other similar experiments.

Results

Cyclic Loading and Mechanical Properties of Disks Before and After Cyclic Loading

The 4 mm diameter disks subjected to 250 μ m amplitude, 100 μ m/sec velocity ramp-release cycles applied 40 times over 20 minutes in uniaxial unconfined

compression generated average peak (Cauchy) stresses of 3.5 ± 1.5 MPa for the disks of 4mm diameter (example in Fig 1C) (Numerical results represent the mean \pm SD, where $N=20$ for values concerning 4mm disks and $N=10$ for 3 mm disks, unless otherwise stated). Disks with diameters reduced to 3mm and subjected to cycles of 400 μm amplitude and 250 $\mu\text{m}/\text{sec}$ speed generated higher average surface stresses of 6.5 ± 1.5 MPa. Stress rates were calculated from the acquired load data and revealed maximum values at the peak load of 4.5 ± 1.4 MPa/s for 4mm diameter disks and 9.0 ± 1.1 MPa/s for 3mm diameter disks. Average strain rates calculated assuming a nominal cartilage thickness of 1.13 ± 0.13 mm (mean \pm SD, $N=40$) were 8.8 ± 0.9 %/s for 4mm disks and 22 ± 3 %/s for 3mm disks. Mechanical testing of 4mm disks before loading revealed intrinsic properties typical of these mature bovine cartilage disks (37) with a compressive matrix modulus, $E_m \cong 0.80 \pm 0.16$ MPa a fibril network modulus, $E_f \cong 10 \pm 1.93$ MPa and a hydraulic permeability, $k \cong (3.0 \pm 0.8) \times 10^{-15}$ N \cdot s/m⁴ (Fig 2). Significant changes in two of these mechanical properties due to the cyclic loading were detected where, after loading, the fibril network modulus, E_f , was decreased by ~ 40 % and the hydraulic permeability, k , was increased by $\sim 40\%$ (Fig 2). The matrix modulus, E_m , appeared to be unaffected.

Cell Viability

Viable cells retaining green calcein-AM, indicative of cytosolic esterase activity and an intact plasma membrane, were observed throughout most of the thickness of

articular cartilage for both loaded and unloaded disks (Fig 3). A thin layer of dead cells staining red, indicating disrupted plasma and nuclear membranes and ethidium homodimer-1 binding to nuclear DNA was always observed in a few cell layers at the articular surface (Fig 3), consistent with previous findings (13). No evident load-related changes in this pattern of cell viability staining was observed on a total of 2 pairs of loaded and control disks.

Denatured and Total Collagen in Disks and Media

The total collagen content was typical of mature articular cartilage (~15% per wet weight) and, as expected, did not change with loading conditions (Fig 4A). Denatured collagen content, extracted in α -chymotrypsin, was also in a range typical for mature cartilage, i.e. around 1-3% of the total collagen content (Fig 4B). In the group of 4mm explants frozen immediately after loading, the loading protocol significantly increased denatured collagen II content by ~50% (Fig 4B). An important observation seen in 4 independent experiments was that this mechanically induced denatured collagen did not persist during subsequent culture, since the loaded group had a similar denatured collagen content as the unloaded group after 10 days of culture (Fig 4B). For the 3 mm disks, denatured collagen was increased by similar absolute value (per mg tissue) after loading but this corresponded to a relative increase of about 100 % compared to the 3mm diameter controls, whose basal level was much lower than the 4mm diameter disks. In a separate experiment we found that the different basal levels of denatured collagen in the different diameter disks was due to the 4mm diameter disk having a

rough peripheral edge created by the biopsy drill while the 3mm diameter disk had this edge neatly trimmed off by a biopsy punch. That is the rings of freshly isolated 4 mm disks which were cored to 3mm disks had a denatured collagen content of 55 ± 7 pMole/mg while their centers had an average denatured collagen content of 9 ± 3 pMole/mg (mean \pm SD, n=6). These results agree with an average of 30 pMole/mg for an intact disk of 4mm and of about 10 pMole/mg for a 3mm diameter disk.

Denatured collagen was also detected in culture media from both loaded and control samples throughout the 10 day post-loading culture period (Fig 5A). Media pooled from days 1-2, and days 3-4 displayed higher denatured collagen content, by about 50 %, for the loaded group compared to controls. The cumulative denatured collagen detected in the media during the 10 day culture period was 1.5 ± 0.4 pMole/mg, much less than the amount seen to be removed from the disk (~ 10 pMole/mg) during this culture period. The total daily loss of collagen in the media decreased for both control and loaded after the first week to about 0.1 ± 0.02 pMole/mg by day 10.

Proteoglycan in Disks and Media

Both loaded and unloaded frozen disks contained similar mean GAG content of 66.95 ± 14 μ g/mg and 64.6 ± 15 μ g/mg for control and loaded sample, respectively, from the frozen groups and 61.6 ± 11 μ g/mg and 60.3 ± 14 μ g/mg for control and loaded samples from the culture post-loading group (Mean \pm SD, N=10). The decrease in GAG concentration seen in the cultured samples is not statistically significant although GAG

loss to the media in the first week of culture (5-7 % of total during 1 week) was statistically higher by ~50% in the loaded compared with non-loaded samples in the 4 days of culture following loading on day 0 (Fig 5B). GAG release then stabilized to the same range for both loaded and control groups (Fig 5B) ($p < 0.05$). The cumulative content of GAG in media (13 days with 250 μ l of media per day) for control and loaded disks ($N=10$) were statistically different at $7 \pm 0.98 \mu\text{g/mg}$ and $8.9 \pm 1.3 \mu\text{g/mg}$ respectively ($p < 0.05$).

Distribution of Denatured Collagen by Immunohistochemical Staining

Immunohistochemical staining was performed on sections from 4mm diameter loaded and control samples, to localize denatured collagen with a monoclonal mouse COL2-3/4m antibody (22) with respect to depth and radial position. Sections from the cyclically loaded samples stained more intensely in the deep and transitional zones compared to unloaded samples where only weak diffuse staining, similar to the staining seen in the upper transitional and surface zones of the loaded samples, was observed throughout the section (Fig.6). Sections from other loaded samples also stained more intensely in the deeper zones compare to control, but with a more pericellular pattern, extending to the territorial matrix. Nonspecific staining of calcified cartilage and bone was observed in all sections including those where secondary antibody alone was applied (Fig 6C), as has been in previous studies (22).

Discussion

In this study we have applied a precisely characterized mechanical deformation to full-thickness cartilage explants containing a thin layer of bone to investigate some functional and metabolic consequences of high but physiological load levels. We found that cyclic unconfined compression imposed on mature articular cartilage was capable of inducing a constellation of changes including immediate (in minutes) reduced mechanical properties, immediate damage (denaturation) to type II collagen, and a prolonged (for days) increase in loss of proteoglycan and collagen extracellular matrix fragments from the loaded disks to the culture medium. The attained load levels were high but physiological from the point of view of the average peak stress, ranging from 2-8 MPa, and peak strain, ranging from 0.25 to 0.40. The number of cycles performed was moderate, 40, the stress rates were in the range of 3-10 MPa/s, and the strain rates in the range of 8 to 25 %/s. Such a cyclic loading regime did not produce fractures, loss of cell viability, or any other obvious changes to the eye but clearly did perturb the tissue to the point of significantly altering ECM structure and turnover.

Several lines of indirect evidence point towards a direct initial effect of mechanical load on ECM in producing the changes which were observed after the cyclic loading. Matrix changes were detected immediately after this loading period, including reduced collagen network tensile stiffness (E_f in Fig 3) and increased hydraulic permeability (k in Fig 3) in addition to a 50-100% increase in denatured collagen content

in the disks (Fig 4). There was no immediately detectable matrix fragments in the medium, but proteoglycan and collagen fragments were found after longer culture periods post-loading (Fig 5) suggesting mechanical changes initially perturbed tissue homeostasis followed by biochemical events and loss of damaged molecules from the matrix. The mechanical induction of collagen denaturation could occur as simply as by direct stretching and disruption of fibrillar structure or could be partly related to heating via viscous dissipation during loading of this viscoelastic material. A direct mechanical effect is supported by our inability to detect any load-related increase in collagenase produced neo-epitope in the α -chymotrypsin extracts using a method (4) similar to the ELISA described in this paper but with a polyclonal antibody against a neo-epitope (COL2-3/4C) produced by collagenase cleavage of type II collagen. Levels of this neoepitope in α -chymotrypsin extracts of loaded samples (7.9 ± 1.3 pmole/mg) were similar to control samples (7.7 ± 1.4 pmole/mg) and to levels observed in normal cartilage (4) suggesting that collagenases were not involved in unwinding collagen II in our experiments. In other preliminary experiments we were also unable to block this denaturation by adding inhibitors such as EDTA and BB94, the latter an hydroxamate compound that specifically inhibits collagenases, to the loading medium (data not shown). Additionally, the recent study by Chen et al (12) supports a direct mechanical initiation of collagen unwinding since in that study the load was only applied to the central 2 mm diameter section of a 4 mm diameter specimen and produced denatured collagen only in the loaded region and not in the periphery. Even after several days of

culture, the peripheral region was unaffected, arguing against mediation of denaturation by a diffusible factor. Chen's study identified a threshold stress rate of 30MPa/s as necessary for mechanical damage of cartilage matrix. In contrast we observed denaturation of collagen at lower stress rates down to 2-5MPa/s. This difference could be due to many factors distinguishing the two studies including different extraction methods for observing denaturation, different species and sites of cartilage origin, as well as the quite different indentation versus unconfined compression geometries and temporal profiles of load and displacement imposed in these geometries. Quinn et al (34) showed a decrease in cell viability in bone-free explants when loaded to 50% strain in contrast to our studies where load-induced viability loss did not occur. This difference could be attributed to either the increased compression amplitude or the absence of subchondral bone in this previous study. Nonetheless, this latter study suggests a decrease in tensile load-carrying capacity of collagen matrix as well as increase in PG turnover in loaded samples that correlates well with our findings.

The current study and other recently published studies by other groups (6, 12, 18, 34, 36) support the notion that mechanical factors play a central role in controlling ECM structure and function during physiological and pathophysiological processes. Our findings suggest that direct mechanical signals initiate unwinding of collagen in cartilage, activating a sequence of functional and metabolic changes related to both cellular and extracellular processes. Collagen turnover could, for example, be largely independent of the collagenases if mechanical unwinding of collagen fibrils exposes

them to other less specific enzymes that could play a major enzymatic role in collagen removal. Similarly, the induction of aggrecanases seen after traumatic injury (28) could be a reflection of a cellular response downstream of the mechanical insult whose goal is to remodel a subfunctional ECM. Thus rather than blocking either collagenases or aggrecanases to halt the progression of cartilage degradation, a more site-directed approach allowing for the benefits of remodeling may be envisioned.

Acknowledgements

This research was supported by Network of Centres of Excellence (Canadian Arthritis Network), the Arthritis Society of Canada, Canadian Institutes for Health Research, Shriners Hospital for Children, NIH, and National Institute for Ageing.

References

1. Atkinson TS, Haut RC, Altiero NJ. Impact-induced fissuring of articular cartilage: an investigation of failure criteria. *J Biomech Eng* 120:181-187, 1998
2. Bank RA, Soudry M, Maroudas A, Mizrahi J, TeKoppele JM: The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation, *Arthritis Rheum.* 43:2202-10, 2000
3. Barker MK, Seedhom BB: Articular cartilage deformation under physiological cyclic loading-apparatus and measurement technique. *J Biomech* 30:377-381, 1997
4. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR: Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99:1534-45, 1997
5. Bonassar LJ, Frank EH, Murray JC, Pagnio CG, Moore VL, Lark MW, Sandy JD, Wu JJ, Eyre DR, Grodzinsky AJ: Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis Rheum* 38:173-183, 1995
6. Borrelli J, Torzilli PA, Grigoriu R, Helfet DL: Effect of impact load on articular cartilage - development of an intra-articular fracture model. *J Orthop Trauma* 11:319-326. 1997

7. Brandt KD. Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. *Ann NY Acad Sci* 732:199-205, 1994
8. Bruckner P, Prockop DJ: Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen. *Anal Biochem* 15:110:360-368, 1981
9. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinski AJ, Hunziker EB: Mechanical Compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Science* 108:1497-1508, 1995
10. Buschmann MD, Grodzinsky AJ: A Molecular Model of Proteoglycan-associated Electrostatic Forces in Cartilage Mechanics . *J Biomech Eng* 117:179-192, 1995
11. Caterson B, Lowther DA: Changes in the metabolism of the proteoglycan from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta* 540:412-422, 1978
12. Chen CT, Burton-Wurster N, Lust G, Bank RA, Tekoppele JM: Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak stress, stress-rate, and loading-duration dependent. *J Orthop Res* 17:870-879, 1999
13. Dumont J, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee M, Buschmann MD: Mature Full-thickness Articular Cartilage Explants Attached to Bone are Physiologically Stable over Long-term Culture in Serum-Free Media. *Connect Tissue Res* 45:259-272, 1999

14. Eisenberg SR and Grodzinsky AJ: Swelling of articular cartilage and other connective tissue: electromechanical forces. *J Orthop Res* 3:148-159, 1985
15. Eisenberg SR, Grodzinsky AJ: Electrokinetic micromodel of extracellular-matrix and other poly- electrolyte networks. *Physicochemical. Hydrodynamics* 10:517-539, 1988
16. Evans CH, Brown TD: Role of physical and mechanical agents in degrading the matrix. In: *Joint Cartilage Degradation*, pp187-208. Ed by FJ Woessner and DS Howell. NY, Marcel Dekker, 1993
17. Farndale RW, Sagers CA, Barrett AJ: A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycoaminoglycans in cartilage culture. *Connect Tissue Res* 9:247-248, 1982
18. Farquhar T, Xia Y, Mann K, Bertram J, Burton-Wurster N, Jelinski L, Lust G: Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact. *J Orthop Res* 14:417-423, 1996
19. Grodzinsky AJ, Kim YJ, Buschmann MD, Garcia AM, Quinn TM and Hunziker EB: Response of the chondrocyte to mechanical stimuli. In: *Osteoarthritis*, pp123-136. Ed by K Brandt, S. Lohmander and M. Doherty. London, Oxford University Press, 1998
20. Hodge WA, Fijan RS, Carlson KL, Burgess RJ, Harris WH, Mann RW: Contact pressure in the human hip measured in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2879-2883, 1986

21. Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR: Increased damage to collagen II in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 93:1722-1732, 1994
22. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Bourne R, Poole AR: Damage to type II collagen in aging and OA starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 96:2859-2869, 1995
23. Jeffrey JE, Gregory DW, Aspden RM: Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on cartilage. *Arch Biochem Biophys* 322:87-96, 1995
24. Jurvelin J, Kiviranta I, Saamanen AM, Tammi M, Helminen HJ: Partial restoration of immobilization-induced softening of canine articular cartilage after remobilization of the knee (stifle) joint. *J Orthop Res* 7:352-358, 1989
25. Langelier E, Suetterlin R, Hoemann CD, Aebi U, Buschmann MD: The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem* 48:1307-1320, 2000
26. Legare A, Garon M, Guardo R, Savard P, Poole AR, Buschmann MD: Detection and analysis of cartilage degeneration by spatially resolved streaming potentials. *J Orthop Res* Submitted 2000

27. Li LP, Buschmann MD, Shirazi-Adl A: A fibril reinforced nonhomogenous poroelastic model for articular cartilage: inhomogeneous response in unconfined compression. *J Biomech* 33:1533-1541, 2000
28. Lohmander LS, Hoerrner LA, Dahlberg L, Roos H, Bjornsson S, Lark MW. Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury. *J Rheumatol* 20:1362-1368, 1993
29. Maroudas A: A physical properties of articular cartilage. In: *Adult Articular Cartilage*, pp 215-290. Ed by MAR Freeman. NY, Pitman medical: Kent, 1979
30. Mow V, Ratcliffe A, Poole A: Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13: 67-97, 1992
31. Muir IHM: A molecular approach to the understanding of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 36:1999-2008, 1977
32. Nelson F, Dahlberg L, Lavery S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, Fraser GL, Brooks E, Tanzer M, Rosenberg LC, Dieppe P, Robin Poole A: Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 102:2115-2125, 1998
33. Pun YL, Moskowitz RW, Lie S, Sundstrom WR, Block SR, McEwen C, Williams HJ, Bleasel JF, Holderbaum D, Haqqi TM: Clinical correlations of osteoarthritis associated with a single-base mutation in type II procollagen gene. *Arthritis Rheum* 37:264-269, 1994

34. Quinn TM, Grodzinsky A J, Hunziker EB and Sandy J D: Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. *J Orthop Res* 16:490-499, 1998
35. Rupert MP, Grood ES, Levy MS: The role of fibrillar proteoglycans in force transmission within tendons. In: *Transactions of the 45th annual meeting*, Orthopaedic Research Society, p79, California, 1999
36. Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD: Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 286:20-29, 1991
37. Soulhat J, Bushmann MD, Shirazi-Adl A: A fibril reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression. *J Biomech Eng* 121:340-347, 1999
38. Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, van den Berg WB: Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum* 43:2121-2131, 2000
39. Thompson Jr RC, Oegema TR, Lewis, JL, and Wallace L: Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model. *J Bone Joint Surg (Am)* 73:990-1001, 1991

40. Visco DM, Hill MA, Wildmer WR, Johnstone B, Myers SL: Experimental OA in dogs: a comparison of the Pond-Nuki and medial arthrotomy methods. *Osteoarthritis Cart* 4:9-22, 1996

Figures and Figure Captions

Figure 4.1 : Schematic of Experimental Design and Mechanical Apparatus. A: Enlarged cross-sectional view inside the compression chamber of the mechanical testing and loading device. B: Representative data of imposed compressive displacement on 4mm diameter cartilage/bone disks and resulting average surface stress for the first and last cycle of the ~25 minute cyclic loading protocol.

Figure 4.2 : Mechanical Behavior of Cartilage Explants Before and After Cyclic Loading. A: Representative example of the stress- relaxation sequence used to characterize the mechanical behavior of explants before and after cyclic loading. B: Mechanical properties of the explants derived by fitting the above data to a fibril-reinforced biphasic model (37). * : $p < 0.05$ comparing Before and After cyclic loading.

Figure 4.3 : Cell Viability in Cartilage Explants Cartilage sections (60 μm thick) from 4mm disks analysed for cell viability using Molecular Probes LIVE/DEAD assay before and after cyclic loading show similar staining patterns for viable (green) versus dead (red) cells throughout the cartilage thickness for both control (A) and loaded (B) samples (Magnification: 42.5X). a = articular surface, t = transitional zone, d = deep zone, b = subchondral bone.

Figure 4.4 : Denatured and total type II collagen contents of explants. A: Total collagen type II accounted for 15 –20 % of the wet weight of explants (1000 pmole/mg

corresponds to about 0.1g collagen II per g tissue wet weight). B: Denatured collagen content is ~1-2 % of total collagen content in controls and is increased by 50-100 % in disks analyzed immediately after the cyclic loading period. Interestingly this load-induced increase in denatured collagen was transient, being removed after a 10 day post loading culture period (4mm cultured in Fig 4B). A similar load-associated increase in denatured collagen was seen in the smaller 3mm diameter disks, where the basal level of denatured collagen was reduced due to a more regular peripheral edge produced by the 3mm dermal punch compared to the 4mm drill bit used for explant isolation. * : $p < 0.05$ comparing loaded to control.

Figure 4.5 : Denatured type II collagen and GAG release to media during culture after loading. Collagen II fragments (A) and GAG (B) released to culture medium after cyclic loading were assessed. Loading occurred on day 0 on these graphs and the day 0 point represents fragments found in the medium from the 48 (A) or 24 (B) hour period before loading. There is an increased release of denatured collagen type II and of GAG to the culture medium after loading compared to unloaded controls. * : $p < 0.05$ comparing loaded to control.

Figure 4.6 : Immunohistochemical localization of mechanically denatured type II collagen. A matched pair (A&B) of control (A) and loaded (B) and additional loaded (D) cartilage/bone disks stained with Col2-3/4m antibody for denatured collagen (22). Negative control (C) stained with secondary antibody only. Control non-loaded samples (A) displayed a very weak staining throughout the section and nonspecific staining of the calcified cartilage and bone (labeled b), below the tidemark (arrows). This non-specific staining of calcified cartilage and bone was also seen when secondary antibody only was applied. (C). Loaded disks (B,D) revealed an increased staining concentrated mainly in the deep zone and extending to the transitional zone which could be both pericellular (D) and diffuse (B). (bar = 100 μ m).

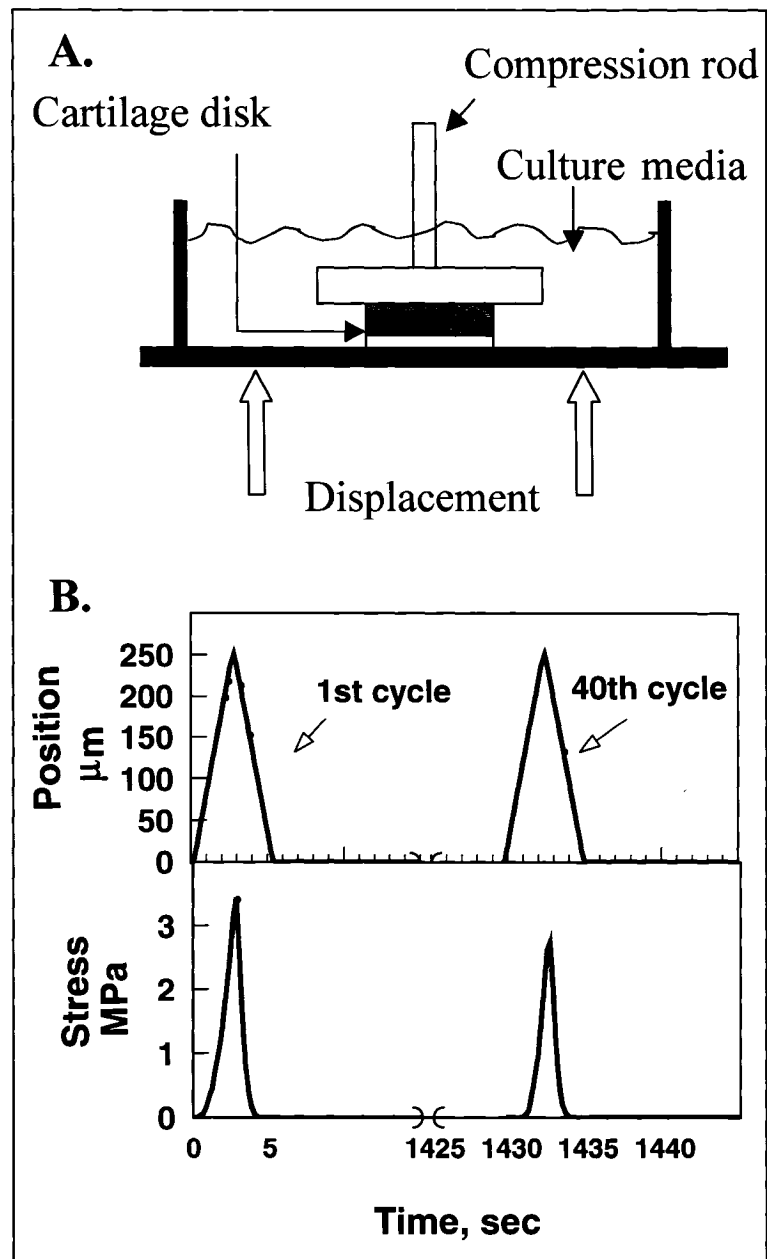


Figure 4.1

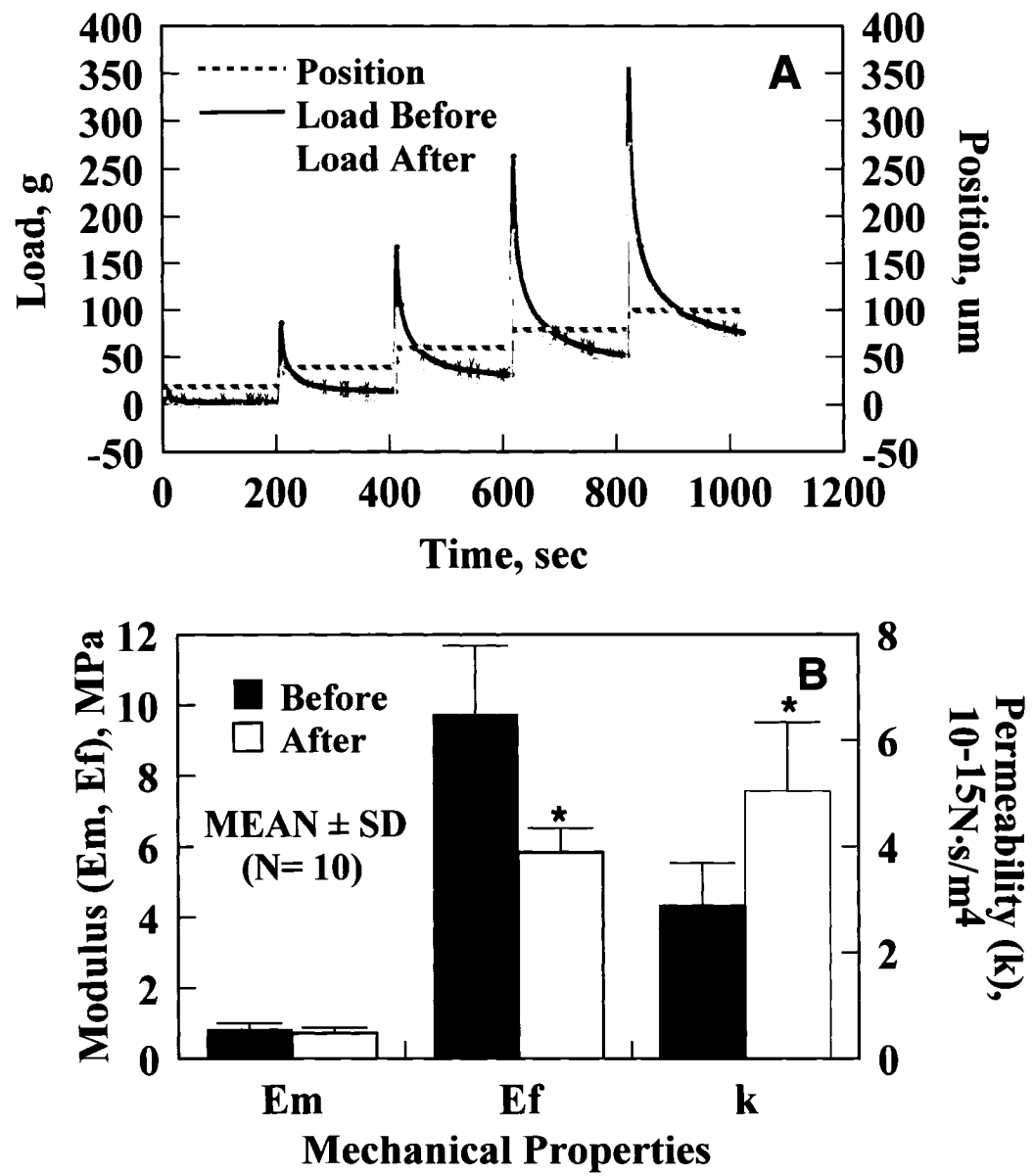


Figure 4.2

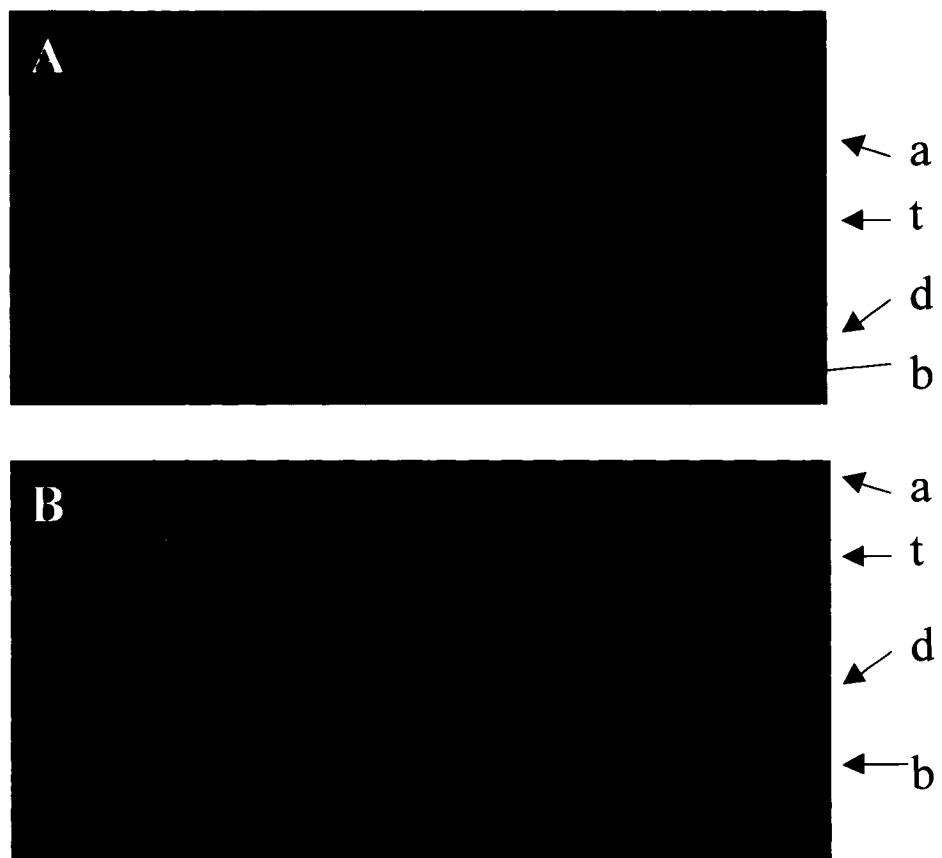


Figure 4.3

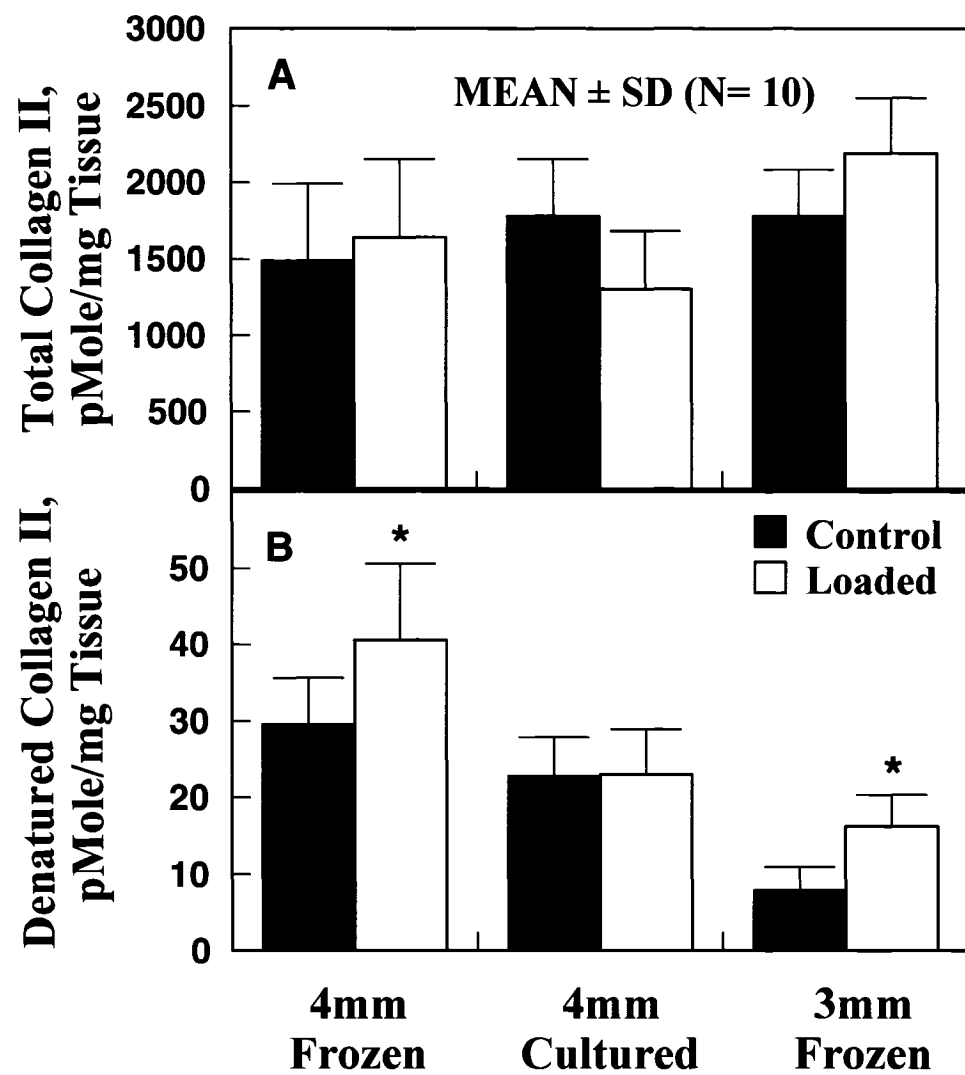


Figure 4.4

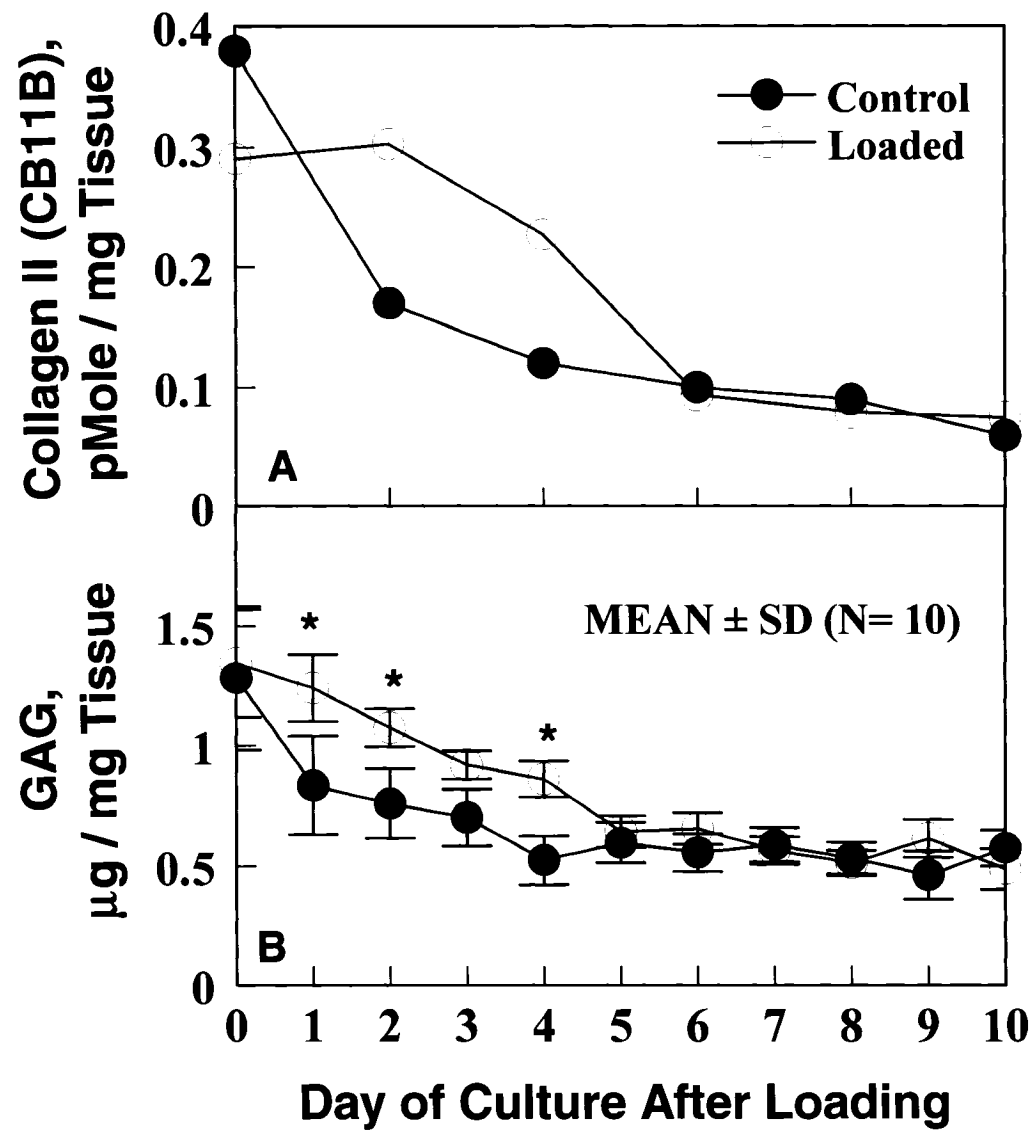


Figure 4.5

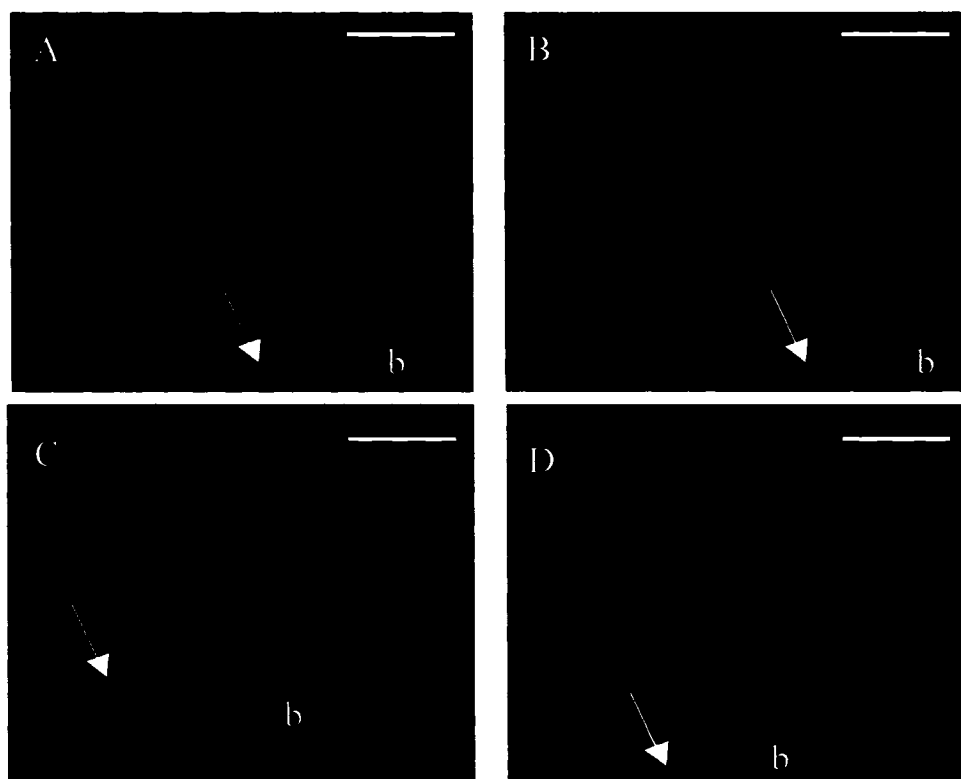


Figure 4.6

CHAPITRE 5. DÉTAILS TECHNIQUES POUR LES PROCHAINS ARTICLES SUR L'OBSERVATION ET LA QUANTIFICATION IN VITRO DE LA MIGRATION DES CSM

Ce chapitre se veut un complément des deux prochains chapitres. Comme les articles suivants comportent des méthodes très détaillées, nous aborderons seulement dans cette section le test de chimiotactisme transmembranaire, utilisé dans les deux articles. Une courte section portera aussi sur l'immunocytochimie.

Test transmembranaire: essai quantitatif de la réponse chimiotactique

Un des tests de migration les plus populaires implique les chambres de Boyden (Chen, 2005). Ce système utilise une chambre en plastique cylindrique avec au fond une membrane poreuse. Cette chambre ou insert nommé Transwell par la Cie. Costar (Fig. 5.1), est ensuite placée dans un puit d'une plaque standard. Dans ces tests les cellules sont déposées sur le dessus de la membrane poreuse alors que les agents chimiotactiques sont placés dans le compartiment du bas, sous la membrane. Un gradient s'établit donc entre les deux compartiments et les cellules stimulées migrent à travers les pores vers la source de gradient dans la direction de l'axe z. En général, les cellules migrées sont uniquement comptées afin d'obtenir des données quantitatives entre les paramètres testés (cellules et agents). En examinant la littérature, j'ai constaté que l'observation de la migration se fait généralement en 2D et j'ai pensé que cette

technique où les cellules migrent en z pourrait être adaptée à l'observation 3D. La procédure qui mène à l'observation des cellules est bien détaillée dans l'article qui suit.

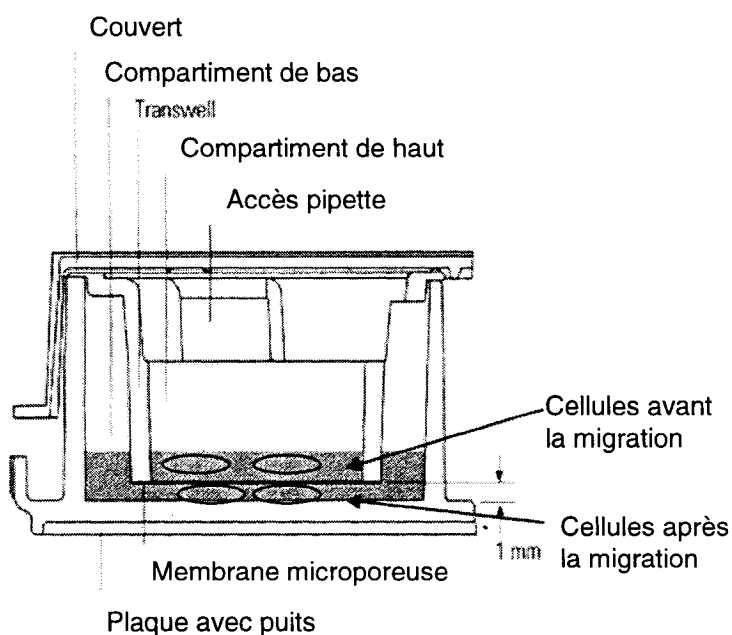


Figure 5.1. Schéma de la chambre modifiée Boyden, aussi appelée l'essai du filtre transmembranaire. (Schéma modifié à partir d'une image de la compagnie Costar®).

Immunocytochimie

La technique de marquage pour l'observation en fluorescence du cytosquelette des CSM est aussi bien détaillée dans l'article. Brièvement, la technique utilise des anticorps spécifiques à certains antigènes, similaire aux détections immunohistochimiques du chapitre 3. La vimentine et la tubuline sont marquées de cette façon. Les anticorps sont par contre dirigés directement sur les cellules fixées et perméabilisées, d'où le préfixe 'cyto' et non 'histo'. L'actine est marquée par la phalloïdine, une toxine dérivée d'un

champignon. Cette molécule est conjuguée à une molécule fluorescente qui permet sa détection (Voir site web de Molecular Probe pour plus de détails). Finalement, le noyau est marqué par une molécule synthétique qui se lie par intercalation au matériel génétique dans le noyau. Cela induit un changement de conformation et rend la molécule fluorescente (Voir site web de Molecular Probe pour plus de détails).

CHAPITRE 6. MIGRATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN 3D: 4 COLOR METHODOLOGY REVEALS SPATIALLY AND TEMPORALLY COORDINATED EVENTS

Abstract

The cytoskeleton plays a central role in many cell processes including directed cell migration. Since most previous work has investigated cell migration in two dimensions, new methods are required to study 3D movement while preserving 3D structure of the cytoskeleton. Most previous studies have labeled two cytoskeletal networks simultaneously, impeding an appreciation of their complex and dynamic interconnections. Here we report the development of a 4 color method to simultaneously image vimentin, actin, tubulin and the nucleus for high-resolution confocal microscopy of bone-marrow stromal cells (BMSCs) migrating through a porous membrane. Several methods were tested for structural preservation and labeling intensity resulting in identification of an optimized simultaneous fixation and permeabilisation method using glutaraldehyde, paraformaldehyde and Triton X100 followed by a quadruple fluorescent labeling method. This procedure was then applied at a sequence of time points to migrating cells, allowing temporal progression of migration to be assessed by visualizing all 3 networks plus the nucleus, providing new insights into 3D directed cell migration including processes such as leading edge structure, cytoskeletal distribution and nucleokinesis. Colocalization of actin and microtubules with distinct spatial

arrangements at the cellular leading edge during migration, together with microtubule axial polarization supports recent reports indicating the pivotal role of microtubules in directed cell migration. This study also provides a foundation for 3D migration studies versus 2D studies, providing precise and robust methods to attain new insights into the cellular mechanisms of motility.

Key Words: bone marrow stromal cells, quadruple labeling, cytoskeleton, confocal microscopy, multiphoton microscopy, chemotaxis, cell motility, cell migration.

Introduction

The use of cell-based therapies, biomaterials and tissue engineering for repair and regeneration of tissues such as cartilage, are expected to provide efficacious alternatives to existing therapies. Improved understanding of the mechanisms underlying the multiple roles of cells involved in tissue engineering and wound healing, including migration, wound contraction and response to mechanical loads, requires robust methods to illuminate the underlying cytoskeletal structures and functions in these processes. The mammalian cell cytoskeleton is mainly composed of microfilaments (MF) and microtubules (MT), both of which are highly conserved, in addition to intermediate filaments (IF), which are cell and tissue specific, with vimentin related to fibroblast-like phenotypes (Helfand et al., 2004). These networks are responsible for cellular spatial organization and are associated with a wide array of proteins which impart functional diversity and permit cell locomotion (Rozycki et al., 1994; Chang and Goldman 2004).

Cytoskeletal filaments are formed by polymerization of monomers and are highly dynamic and labile structures sensitive to physico-chemical environmental changes (Hibbs et al., 2000). In addition, each network is in the presence of its monomers in the cytoplasm and is partly masked by a variety of associated soluble and insoluble proteins which can complicate immunocytochemistry procedures (Arcangeletti et al., 1997). Limiting factors for 3D resolution of cytoskeletal elements in immunofluorescence lie in the concurrent achievement of good structural preservation and detailed labeling

(Robinson et al., 2004). Most cytological processing methods are not optimized for 3D cell preservation, and therefore do not harness the full potential of confocal microscopy to assess cell structures representative of the physiological steady state (Arcangeletti et al., 1997). To date, structural work in this area has mostly involved the labeling of two cytoskeletal networks in single cells, with important exceptions of triple immunofluorescence (Herzog et al., 1994; Baschong et al., 1999) but without quadruple labeling including the nucleus. These elements are therefore usually observed as separate entities or in pairs, when in fact they form a complex interwoven system (Chang and Goldman, 2004), where cytoskeletal crosstalk is now deemed essential, particularly between MT and MF (Small et al., 1999a; Rodriguez et al., 2003; Etienne-Manneville and Hall, 2003) and to a lesser extent, also with IF (Goldman et al., 1999). The complexities involved in imaging moving cells in 3D matrices has also resulted in most information related to the cytoskeleton in cell migration being gained from in vitro studies carried out in 2 dimensions (Palecek et al., 1997). Although it is believed that mechanistic understanding of migration along a 2D surface is relevant to 3D movement (Laffenburger et al., 1996), some studies in 3D gel matrices have demonstrated significant differences in cell morphologies as well as in spatial organization and molecular composition of adhesions complexes (Cukierman et al., 2001; Grinell, 2003), and hence, different migration behavior (Friedl and Bocker, 2000; Wolf et al., 2003). Unfortunately there are no reports to date of simultaneous visualization of all major cytoskeleton networks and nucleus in 3D, in a controlled directed-migration system.

In this report we describe such a method using 4 fluorescent stains to simultaneously label the main cytoskeletal systems of vertebrate cells, namely vimentin, tubulin and actin in addition to the nucleus for confocal 3D visualization of the cytoskeleton of rabbit bone marrow stromal cells (BMSCs) migrating through a porous 10 μm thick polycarbonate membrane. The quadruple labeling combines a direct antibody (Cy3-anti-vimentin) and a labeling with a secondary anti-body (anti-tubulin) with two intercalating fluorescent markers (Alexa 488-phalloidin for actin and TOTO for DNA) resulting in a strategy that minimizes background fluorescence to a degree which would hardly be achievable by primary and secondary antibody labeling alone. This multilabeling study, based on a previous method for chondrocytes in culture by Blanc et al. (Blanc et al., 2005), has been adapted to BMSC migrating through a porous membrane and provides a 3D model close to physiological reality while still allowing distinct visualization of the complex interplay between cytoskeletal elements involved in cell migration. We have tested numerous protocols in order to achieve optimal cell structure preservation in 3D together with ideal labeling intensity and fine detail resolution by examining fixative type and detergent concentrations, temperature, pH and physical manipulation, all of which can influence cytoskeleton network structure, in addition to the sensitivity and selectivity of antibody-antigen reactions (Larsson et al., 1998).

To obtain optimal preservation and structural imaging, we tested several fixatives including precipitating agents and the crosslinking agents paraformaldehyde (PFA) and glutaraldehyde (GA). Permeabilisation with detergents Triton X100 or Octyl-Poe at

varying concentration was also performed either before, simultaneously or after fixation. Precipitating agents serve here as “negative” controls since they are known to flatten samples, thereby limiting out of focus light, which can be seen as beneficial in projected images of non-confocal microscopy. PFA has a relatively slow rate of crosslinking compared to GA, but is 10 times faster in diffusive penetration rate (Hopwood, 1967) and can therefore be useful in preserving physiological cell structure (Bacallao et al., 1995). Although highly labile elements such as tubulin are not well preserved with PFA (Palacek et al., 1997), we have included it based on its wide application, as in the few previously applied 3D methods (Bacallao et al., 1995). The slower penetration rate of GA compared to PFA is compensated by its faster crosslinking and its remarkable preservation capabilities for subcellular organelles (Hibbs et al., 2000). However, GA increases autofluorescence, and has the ability to change protein tertiary structures, and hence to destroy or mask epitopes and limit antibody accessibility (Larsson et al., 1988). No single fixative has emerged as an ideal fixative for preserving all three networks in all conditions and cell types so that studies that examine these parameters such as ours are essential.

Here we focus on BMSCs, in a rabbit model, based on their role in cartilage regeneration therapies. Recent work by our group has identified an implantable biomaterial that is capable of increasing recruitment of BMSCs from bone marrow to cartilage lesions to stimulate repair (Chevrier et al., 2006; Hoemann et al., 2005). BMSCs can also be induced to express markers of various connective tissues making

them well suited for cell therapy in regenerative medicine (Shapiro et al., 1993). Despite the recent interest in BMSCs and the large scale use of rabbit models in joint related disorders studies (Rudert, 2002), there is a paucity of functional cell studies such as in vitro chemotaxis and relevant chemotactic agents for this specific cell type. We found recombinant human platelet derived growth factor (PDGF) at relative high concentration to be a potent chemoattractant, and we have elaborated a robust method that permits the simultaneous and precise labeling of the major cytoskeleton elements of BMSCs, while preserving their 3D structural integrity in transmembrane directed cell migration experiments.

Materials and methods

Cell Isolation and Sample Preparation

Femurs from New Zealand White Rabbits (N=5) weighing between 3 and 4 kg were used in this experiment. To isolate femurs, both legs were first shaved from the tarsal joint to the hip using a Oster Animal Clipper with a size 40 blade set. Femurs were cut from the joint and placed in sterile Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) + HEPES10mM + 2% FBS + 100 units Penicillin and 0.1 mg Streptomycin /mL (sHBSS+) on ice. The femurs were then cut open at both epiphysis with a bone cutter and flushed with 10 ml syringes containing sHBSS+ into a 100 mm Petri dish. A dispersed bone marrow cell suspension was then prepared by repeated pipetting of the cell suspension with decreasing size needles, from 18g to 23g and the

suspension filtered through a 70 μm mesh to remove remaining particulates of fat or bone and centrifuged and washed two times in HBSS+. Erythrocytes were lysed in a 1 ml aliquot with 0.14M ammonium chloride and remaining cells counted in a hemocytometer and seeded at 10^7 cells per 100 mm Petri dish and adherence purified for propagation in 25 cm² culture flasks for colony forming efficiency (CFE) analysis. CFE was estimated by fixing cells in the flask at day 14 using methanol for 10 min, staining with Toluidine blue (1% w/v in PBS) for 5 min and counting colonies under a dissecting microscope (data not shown). Culture media was DMEM low glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with fresh 10% FBS (Sigma, St-Louis, MO) and 100 units Penicillin and 0.1 mg Streptomycin /mL (Sigma, St-Louis, MO).

Cytoskeleton Imaging on 2D Surfaces

All samples that were immunolabeled, with the exception of those used in migration studies described below, were cultured on no.1 sterile 12mm round coverslips (EMS, Hatfield, PA). The coverslips were sterilized by ethanol soaking and ultraviolet light drying and placed in 24 well plates on which cells were seeded at a density of 40,000 cells per ml with 500 μl per coverslip and incubated for at least 24 hrs to ensure complete adherence and cytoskeleton stabilization prior to processing.

Permeabilization and Fixation

For all conditions below, prior to processing cells, culture medium was aspirated and cells washed 3×5 min in mHBSS (136.9 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.44 mM

KH_2PO_4 , 0.336 mM NaH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4mM NaHCO_3 , 2mM EGTA, 5.5 mM d-Glucose and 0.11% w/v 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), pH ~6.5). Subsequent permeabilisation and fixation (perm/fix) were also performed in this buffer, unless otherwise stated, since the low pH, calcium chelation and presence of magnesium is known to aid in the cytoskeletal stabilization and preservation (Bacallao et al., 1995). As outlined in Table 1, procedures are divided in 3 classes according to the fixative agents used, precipitating agents, PFA (Sigma, St-Louis, MO) or GA and the sequence of permeabilisation and fixation. Concentrations below are expressed as %w/v for PFA and %v/v for GA, Triton X-100 and Octyl Poe.

Precipitating Agents (conditions 1 and 2 in Table 1)

Cells are either fixed in an ice-cold mix of equal volume of methanol and acetone or in ice-cold methanol alone for 6 minutes.

Paraformaldehyde (conditions 3 to 6 in Table 1)

In conditions using PFA as the fixation agent, permeabilisation is either performed before, after or during fixation. Only freshly prepared PFA was used. In the standard condition, cells are fixed in a 4% PFA solution in mHBSS for 20 min at 37°C prior to permeabilisation in a 0.5% Triton X-100 solution in mHBSS for 15 min. In the delayed fixation, the sequence is inverted, and cells are permeabilised first in 0.3% Triton X100 solution before fixation in 4% PFA at 37°C for 10 min. Finally, in the instantaneous method (Arcangeletti et al., 1997), perm/fix are performed simultaneously

in one step, with a 0.5 % Triton 1% PFA buffer for 10 min at 37°C. The concentration of Triton X-100 was optimized, as suggested previously (Arcangeletti et al., 1997) using several concentrations - 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 20% v/v where good results were obtained with all concentrations below 10% (data not shown). Only the lower concentrations, namely 0.5 and 1%, were examined in multiple stains, since their gentler effects on cells may be important for experiments on polycarbonate membranes, a substrate towards which cells exhibit reduced adhesiveness, compared to glass, that is necessary for migration.

Glutaraldehyde (conditions 7-13 in Table 1)

The permeabilisation detergent in procedures using GA as fixative is also added either before or during the fixation. For smooth fixation, based on the procedure of Small et al. (1986) and later from Baschong et al. (1999) who replaced detergent Triton X-100 by Octyl-Poe, cells were permeabilized in mild non-ionic detergent in the presence of a very low concentration of GA acting as a prefixation to stabilize the cell structure in mHBSS. Detergents used were either Octyl-Poe or Triton X100, both at 0.5% and 2%. All 4 conditions incorporate a GA concentration of 0.125% during permeabilisation, for 10 minutes at 37°C that is then followed by a 20 minute fixation in 1% GA mHBSS at room temperature. For the instantaneous method, cells were also perm-fixed with a mix of low detergent and low GA concentrations, but without any post fixation. Kpipes buffer in the original article (Bacallao et al., 1995) was replaced by mHBSS, as the latter is routinely used with musculoskeletal type cells as opposed to

endothelial cells for the former. Cells were perm-fixed for 10 min with 0.3% GA + 0.1% Octyl Poe or Triton X-100 at room temperature. A second mix of 0.5% GA + 0.3% Octyl Poe or Triton X-100 was also tested. This latter method was supplemented with 0.3% PFA to constitute the final optimized processing method (condition 13 in Table 1) allowing the procedure to profit from the rapid penetration of PFA and the fast crosslinking of GA.

Post-Fixation Treatment

Following perm/fix, cells from all conditions were washed 3×5 minutes in mHBSS. For cells treated with precipitating agents or PFA based fixatives, cells were then incubated for 20 min in 1% Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St-Louis, MO) to quench aldehyde residues (Arcangeletti et al.1997).

Two methods using 3 different concentrations of sodium borohydride (NaBH_4) (Sigma, St-Louis, MO) were applied to identify a reliable method to remove autofluorescence induced by GA based methods of fixation. To evaluate these methods, additional samples were first washed once in mHBSS and fixed with a 1% GA solution in mHBSS, prepared fresh before use, for 10 min at RT under slight shaking. They were then washed 2×5 min in mHBSS and immediately treated with one of 3 different concentrations of NaBH_4 (0.05, 0.5 and 5 mg/ml) in either ice cold buffer on ice for 2×10 min or once with 37°C pre-heated buffer at 37°C for 10 min, both at pH 8.0, which increases the half-life of NaBH_4 in solution (Bacallao et al., 1997). For GA fixed

samples, the method we evaluated (data not shown) to be to most effective in quenching background fluorescence, was 0.5 mg/ml NaBH₄ in ice cold buffer incubated for 2 × 10 min on ice and was used subsequently in these studies. Cells were washed 3 × 5 min afterwards in PBS. Before labeling, non specific binding sites were blocked by incubation in 10% goat serum solution in mHBSS added with 0.05% Tween-20 (Sigma, St-Louis, MO) for 30 min. Subsequent labeling steps were performed in mHBSS supplemented with 1% Goat serum, 0.05% Tween-20 (supplemented mHBSS) with slight rocking agitation except otherwise noted.

Fluorescence Labeling

Triple Stain

The sequence of labeling for multiple stains can have a dramatic effect on image quality due to cross reactions and steric hindrance. Indirect labeling using secondary antibodies should precede direct labeling with conjugated antibodies or specific toxins such as phalloidin, and polyclonal antibodies should be used prior to monoclonals (Baschong et al., 1999). After one cell wash in supplemented mHBSS, cells were labeled first with 2.5 ug/ml (1:400 dilution) anti-vimentin Cy3 conjugated monoclonal antibody (Sigma, St-Louis, MO) with 400 ul per coverslip for 1 hr at 37°C inside a humidified chamber. Cells were then washed 3× and labeled for actin with 0.165μM (1:40 dilution) of Alexa fluor 488 Phalloidin (Molecular Probe, Eugene, OR) for 20 min at 37°C. Cells were then washed 3 × 5 min. before counterstaining the nucleus with a

1:20,000 dilution of Hoechst 33258 (Molecular Probe, Eugene, OR) in PBS for 2min and finally washed $3 \times$ in PBS before mounting.

Quadruple Stain

After one cell wash in supplemented mHBSS, cells were labeled first with a 10 ug/ml of monoclonal anti-tubulin β (Chemicon, Temacula, CA) incubated for 1 hr at 37°C. After 3×5 min rinses, cells were incubated with 10 ug/ml secondary goat anti-mouse coupled to Alexa 405 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 1 hr at 37°C. Cells were then washed before vimentin and actin labeling performed as described above for the triple stain, but in mHBSS added with 1% BSA instead of goat serum, since the latter was found to hinder actin staining and create non-specific background when staining for vimentin. Cells were treated with 1mg/ml RNase A for 20 min at room temperature (RT) to destroy RNA fragment and non specific RNA-related signal. Nuclear DNA was finally counterstained with 3 μ m TOTO-3 (Molecular Probe, Eugene, OR) in PBS and incubated at RT for 30 min. Titters for all labeling agent and incubations were optimized independently (data not shown). Controls with the omission of primary antibodies were also routinely performed.

Live Cell Membrane Labelling and Cell Height Measurements

Lipophylic Vybrant DiI cell labelling solution (Molecular probes, Eugene, OR) was used to label live cell membranes for cell height measurements. The seeded cells on coverslips were directly labelled in the 24 well plate by aspirating spent media and

adding DiI solutions in mHBSS. Two DiI dilutions, 5 and 10ul/ml, with incubation times of 2.5, 5, 10, 15, 20 and 30 min were tested to find optimal labelling conditions. Cells were then washed 2 × with fresh media, re-incubated in complete media and observed within the following hour. Live cell height was measured using 3D reconstructions (Imaris from Bitplane) of cells (n=10) stained for 20 min with 10ul/ml of DiI live-cell stain and compared to cell height after fixation that was measured from X-Z and Y-Z sections of 3D stacks of randomly selected cells using built-in functions in the LSM 510 software by visually identifying the bottom and top of the cells using actin and nucleus staining as references based on their membrane proximity.

Mounting

Mowiol solution was prepared by dissolving 20g of polyvinyl alcohol (Sigma, St-Louis, MO) in 80 ml mHBSS by stirring for about 1 hr on a heating plate, after which 40 ml glycerol was added and stirred for another hour at room temperature. Finally, 0.9 g of n-propyl-gallate was added as an anti-fade agent to the solution and stirred while protected from light on a heating plate until dissolved. Mowiol mounting medium was stored at 4°C in a brown amber bottle protected from light. Coverslips were mounted cell-side up on a Superfrost slide between 4 dried nail polish drops placed outside the area of the cover slip to support a second coverslip to be placed on top of the cell-seeded coverslip, thereby preventing cell distortion in the z axis due to the coverslip weight. A drop of Mowiol (refractive index 1.38 close to that of water) was placed on top of the cells and the second coverslip, a larger 22mm sq. no.1.5 coverslip (Corning, Actin, MA)

was placed on top. This coverslips was small enough (22mm^2) to limit possible deformation due to the lens objective. Once dried, the system was sealed with clear nail polish.

Directed Cell Migration Studies in 3D

Chemotaxis

BMSCs chemotaxis was performed in Costar Transwell (Corning, Acton, MA) systems with polycarbonate filters bearing 8 μm diameter pores. Human PDGF-bb (R&D Systems, Minneapolis, MN), known to be involved in wound healing and chemotactism (Lepisto et al., 1992), was used as chemoattractant for rabbit BMSCs at concentrations of 100, 50, 10, 1, 0.1 PDGF-bb ng/ml. Cell densities of 300,000, 150,000, 60,000 and 30,000 cells/well were used (data not shown) to identify an optimal density of 50,000 cells based on maximal chemotactic index and ease of counting without excessive cell overlap. Chemokinesis was evaluated by adding to the upper well the same concentration of PDGF-bb as in the lower wells. Cells were placed in the upper well of migration inserts 30 min before adding chemoattractant in the lower well, to allow cells to settle prior to forming the gradient. At 30 min, since the bottom wells of this system are accessible without removing the cell-containing inserts, media was removed and 500 μl aliquots of chemotactic agents were gently added. Negative controls consisted of filling the basal wells with the same media in which cells are seeded in the apical wells, DMEM low glucose with PS without FBS.

Processing and Mounting of Filter Inserts

Inserts were fixed at varying time points after gradient formation during migration. Samples were processed for quadruple labeling at 30 min, 1, 2, 3 and 4 hrs.

Membranes were processed as described above for coverslips, by adding reagents in the apical and basal chambers of the system to ensure homogenous labeling. Wells were filled and inserts were passed sequentially from one well to the other. Once stained, filters from the inserts were cut from their plastic support with a scalpel blade. Filters were gently placed on a slide with the lower surface containing migrated cells facing up, between 4 dried nail polish spacers as described above. One drop of Mowiol was added and the system was then covered with a No. 1.5 22 mm² coverslip.

Confocal Microscopy and Image Processing

Fluorescence imaging was carried out using an LSM 510 META Axioplan 2 confocal laser scanning microscope (CLSM) with a C-Apochromat 40X/1.2 water immersion objective (Carl Zeiss, Germany). Meta analysis of the 4 fluorochromes were performed to select optical setup and minimize overlap as described previously (Blanc et al., 2005). Probes characteristics and optical settings for the image acquisition are summarized in Table 2. Photobleaching induced by 4 laser z optical sectioning (stack) of the samples was assessed by comparing labeling intensity from the first section to the last section of the stack and was found to be minimal (data not shown).

Results

Colony Formation Efficiency of BMSCs

Adherence purified rabbit BMSCs morphology was fibroblastic with good adherence and colonies varying in size at 14 days post-isolation. Colony forming efficiency (estimated colony number per initial inoculum cell number) with initial inoculum of 10^7 cells was estimated at 2×10^{-6} .

Processing Method Evaluation using Triple Staining

For the initial testing of a broad range of protocols only actin and vimentin were labeled along with the nucleus. Tubulin, being the more labile element of the cytoskeleton, is reportedly poorly preserved in alcohol or PFA based methods of fixation (Baccalao et al.,1995) and was labeled later using methods that were prescreened by triple labelling.

Precipitating Agents

Methods using precipitating agents such as methanol or ethanol-acetone for perm/fix completely prevented actin labeling (Fig 1A). These agents however preserved vimentin and provided a 2D rendition of the intermediate filament network. Cell height measurements indicated that these agents caused cell flattening that is not acceptable for 3D imaging (similar to Fig 3C).

Paraformaldehyde

Effects of PFA on BMSC cytoskeleton preservation were analysed for methods incorporating detergent permeabilisation either before, after or simultaneously with fixation. Permeabilizing the cells before fixation in the delayed fixation method (# 4 in Table 1) caused cells to detach slightly from the substrate (Fig.1B) revealing actin and vimentin networks with loose cytoplasmic extensions folding around each other and without clear stress fibers but rather a diffuse network of MF and IF. Vimentin also showed diffuse staining indicative collapse or depolymerisation due to this delayed fixation procedure. Permeabilisation after fixation (# 3 in Table 1) flattened the cells in a manner similar to precipitating agents and signal intensity in this case was faint probably due to steric hindrance from cellular protein trapped inside cells by fixation prior to permeabilisation (Fig 1C). Instantaneous perm/fix (# 5,6 in Table 1) yielded labeling that was bright and highlighted well preserved structures with high resolution and with minimal actin dots or loose extensions, for all samples, independent of concentrations of agents within the tested ranges (Fig.2 top row). However, these methods also induced undesirable cell flattening (Fig. 3C) that was evident when examining stacks and finding little pattern differences in the z-direction, suggesting a flattened structure. Cell height measurements confirmed the cell flattening (Fig. 4) for both versions of the instantaneous PFA methods (# 5,6 in Table 1).

Glutaraldehyde

GA fixation was either performed after permeabilisation that contained a small amount of stabilizing fixative (smooth fix # 7-10 in Table 1) or instantaneously with detergent permeabilisation (# 11,12 in Table 1). In the first case, both actin and vimentin networks were complete and easily discernible for all sub-conditions of this GA-based smooth fixation (Fig 2 second row), whether using 0.5% or 2% of either Octyl Poe or Triton X-100. Networks showed pattern variation with cell depth which was indicative of good cell preservation and cell heights were similar to live cells (Fig 4). The fixation method using both low detergent and low fixative concentrations simultaneously (# 11,12 in Table 1), revealed a nicely preserved actin network, despite some punctate staining, while the vimentin network presented as a relatively contracted network, but with good labeling detail. The vimentin network seemed to be composed of finer fibrils than with other methods, i.e. with no preponderant filaments, but still radiating throughout the cytoplasm from the nucleus and lightly retracted without direct contact at cell edges and extensions (Fig 2 third row). This disrupted appearance was evident when using all 4 GA methods, with either mHBSS or Kpipes as buffer. Nonetheless, this gentle fixation led to the best preservation of cell volumes (Fig 3B, 4). The addition of PFA to this fixation method (# 13 in Table 1) resulted in increased resolution and preservation of the vimentin network along with preservation of cell height (Fig 2 bottom row, Fig 4). Actin dots (arrows in Fig. 2) were seen in all samples with GA as fixative in either prefixation or instantaneous methods, as opposed to instantaneous

fixation in PFA.

Quadruple Cytoskeletal Labeling

Emission spectral analysis (META detector) of each probe present alone in monostained cells excited by each of the four laser lines used in this study confirmed the absence of signal overlap between fluorophores under the optical setup used for imaging cells labeled for actin, vimentin, tubulin and nucleus as described previously (Blanc et al., 2005). The use of 0.5 % GA 0.3 % PFA 0.3% Triton X-100 followed by labeling with the procedure described in the Methods provided simultaneous high resolution detailed networks of actin, vimentin and tubulin along a finely localized counterstained nucleus in both cells cultured on glass coverslips or in polycarbonate porous membranes (Fig 5). MFs were bundled up in stress fibers, characteristic of spread cells. Intermediate filaments radiated throughout the cytoplasm from the perinuclear envelope while tubulin spread out as a well defined network originating from a more focal point near the nucleus usually identified as the MicroTubule Organizing Center (MTOC) or centrosome.

Temporal Analysis of the Cytoskeleton in BMSCs Migrating Through a Porous Membrane

BMSCs showed directed migration towards certain concentrations of hPDGF-bb with a maximum chemotactic index at a PDGF concentration of 50 ng/ml (Fig.6). Chemokinesis controls showed no increase in migration at any concentration. This 50

ng/ml concentration was further used here in quadruple labeling of BMSCs migrating through porous membranes. The temporal progression of migration was observed by fixing filter inserts in 0.5% GA- 0.3% PFA-0.3% Triton X-100 at times of 30 minutes, 1, 2, 3 and 4 hours after addition of chemoattractant. The first time point 30 min after addition of PDGF, clearly indicated that directed migration was in progress, with small actin and tubulin cytoplasmic extensions already reaching the lower surface of the membrane (Fig.7). Vimentin signal was also visible in the center of some pores, but only as a loose network, not attached to the substrate. (Fig.7). Cellular extensions appeared to line the pore walls adopting a cylindrical 3D or toroidal morphology. In corresponding magnified images of representative cells, tubulin and actin filament were clearly defined at the leading edge of this toroidal structure of cells progression through the pore (Fig 8), while the bulk of vimentin colocalized around the nucleus towards the initial side of the support. At this stage, no clear attachment sites, identified by dense actin structure at the cell edge, are visible on the migrated side.

Subsequent time points from 1 to 4 hours after addition of chemoattractant show clear filamentous extension in 3D evolving actin stabilizing and anchoring structures on the migrated side of the membrane (1hr, 2hrs in Fig 7 and 8). Tubulin colocalized with actin at earlier times, with a fine detailed network throughout the cytoplasm of cell extensions on the migrated side at all times. At 2 hours, cell spreading can be seen clearly where actin and tubulin extend on the migrated side. Vimentin networks are also visible, but are mostly still concentrated within the pore around nuclei. It should be noted

that cell nuclei are visible on the migrated side in about 10% of cells at 2hr, meaning that some nuclei pass more freely through the pores, with other cells pull on the nucleus remaining in the pore. At 3hrs, most cells adopt a typical BMSC monolayer non-confluent morphology, with star shaped extensions, with parallel actin stress fibers along those extensions, terminating in actin rich domains (Fig 7). Cells for which nucleus has not yet passed through the membrane adopted a circular morphology around the periphery of the pore in which the nucleus is still present (3 hrs Fig. 8). Actin networks in these cases arise radially from the pore as does the tubulin network, with both networks still very much present in the pores. At 4 hrs, cells clearly exhibit monolayer type morphologies (Figs 7, 8), with extensive networks for all 3 elements extending in the cytoplasm similar to those of monolayer cells (Fig. 5). Cells also start to gain height and morphology similar to that in monolayer.

Discussion

In this report we have imaged the dynamics and organization of the nucleus and cytoskeleton during 3D migration by developing a method that labels all three main cytoskeletal elements simultaneously with the nucleus of BMSC while assuring preservation of cell structural integrity. The advantages of this procedure lies in its ability to permit detailed structural observations of these elements in single cells, allowing observation of possible interactions between components in a three-dimensional environment more representative of *in vivo* migration versus two

dimensional assays.

Optimal Processing and Imaging Methodology

After screening several methods we found that the simultaneous permeabilisation-fixation approach using both glutaraldehyde (GA 0.5%) and paraformaldehyde (PFA 0.3%) with Triton X-100 (0.3%) for 20 minutes (#13 in Table 1) achieved optimal cell structure preservation in 3D together with ideal labeling intensity and fine detail resolution when used in our quadruple labeling of cells during migration. As anticipated, traditional methods used for 2D microscopy such as PFA fixation before or after permeabilisation and simple methanol or acetone-methanol permeabilisation, negatively affected 3D cell structure and overall network architecture, consistent with other studies using diverse cell types (Bacallao et al. 1995; Arcangeletti et al., 1997). Techniques using simultaneous perm/fix with either GA or PFA revealed actin and vimentin as two separate but interwoven networks. Generally, these images show cytoskeleton properties expected for bone marrow stromal cells and other fibroblast-like cells, such as MSC hallmark actin stress fibers (Kinner et al., 2002) and vimentin arranged in a perinuclear fashion with dense extensions throughout the cytoplasm (Baschong et al., 1999; Carnes et al., 1997). Actin dots or punctate actin observed in some samples could indicate either incomplete extraction of monomers and oligomers prior to or during fixation (Steinmetz et al., 1997) or possible actin associated with adhesion complexes with the substrate (Langelier et al., 2000). As opposed to GA methods, PFA in these techniques however induced marked cell flattening. The use of

both fixatives in the simultaneous pem-fix method (#13), prevented cell flattening while preserving structure details, especially vimentin that was only well preserved with PFA.

The last family of fixation methods, called smooth fixation, involves a permeabilisation step that includes small amounts of stabilizing GA before a stronger fixation. Permeabilizing before or during fixation extracts some intracellular proteins such as cytoskeletal binding proteins and monomers to reduce background staining and allow better access and greater epitope availability, as soluble proteins could mask target proteins from the labeling agents (Arcangelitti et al.,1997; Small et al., 1999b). In our study, Triton X-100 was used instead of Octyl poe based on experimental data and reports showing Octyl Poe induced cell collapse in the z axis (not shown) as well as cell detachment and even cells lysis (Bacallao et al.,1995; Baschong et al.,1999). Such apparently minor technical modifications in the procedures finally resulted in nicely preserved actin networks and 3D morphologies of the fixed cells, but again with a seemingly disrupted and fainter vimentin network. Finally, in light of the triple labeling data, instantaneous GA-PFA method was chosen to examine additional staining of tubulin. The resulting quadruple labeling showed tubulin distribution as expected for fibroblastic-cells (Baschong et al., 1999). The finely detailed images of this highly labile network actually confirmed the robustness of the chosen GA-PFA method by preserving network detail, in both cells cultured on glass and on the polycarbonate membranes used for 3D migration studies.

Directed Migration in 3D

Our observations of cells migrating through porous membranes are compatible with some of the general macromolecular mechanisms seen in 2D directed migration, but with some important differences. As in 2D chemotaxis, the initial response of cells to chemoattractant is polarization and extension of protrusions in the direction of incoming gradient (Firtel et al., 2000). However, leading processes in 3D are not broad sheetlike lamellae as seen in 2D (DeMali et al., 2004), but rather a 3 dimensional crawling cylindrical structure seen from below as a toroid. Although tubular cell pseudopodia have been observed in 3D matrices, (Friedl and Brocker, 2000; Martin and Kolega, 2006) none were found to have a toroidal morphology with the presence of MT at the very distal end. In comparison with this literature, these protrusions are difficult to characterize. Although resolution does not permit visualization of individual filaments, actin organization at the very front at 30 min is not consistent with lamellae, which exhibit dense dendritic-like actin networks. These protrusions are also not consistent with filipodia, described as finger-like membrane extensions, displaying longitudinal actin organisation in the direction of migration (Welch et al., 2002) and devoid of MT (Etienne-Manneville, 2004). In our images of 3D migration, membrane extensions do not appear finger-like, but are rather continuous in the form of a hollow tube, and MT are clearly present.

Although MT have been shown to be present in the leading edge of motile cells, most studies reveal MT slightly lagging behind actin-driven leading edges, and never in

filipodia (Etienne-Manneville, 2004). This study clearly shows the MT in the leading structures, reaching the very tip of the leading edge protrusion. Our observations of MT in these leading structures could imply a fundamentally different cytoskeletal architecture in cells migrating in 3D, with leading processes arranged differently than in 2D, compatible with distinct differences in structure and composition of other cytoskeletal elements such as adhesion complexes in 3D compared to 2D (Cukierman et al., 2001). The consistent presence of MTs at the leading edge and clear orientation toward the direction of migration also highlights their essential role in directed migration as hypothesized in early studies (Vasiliev, 1976). Emerging direct evidence now shows that MTs influence cell polarization and directed cell motility by crosstalk and interaction with actin via modulation of common effectors (Nelson et al., 2003; Ridley et al., 2003; Etienne-Manneville, 2004; Watanabe et al. 2005). The temporal and spatial colocalization of MT and MF at the leading edge in our study underscores this close association and further agrees with studies observing MT penetration into active lamellipodia, suggesting that MT polymerization could drive actin-based protrusion growth (Waterman-Storer et al., 1999) and play a direct role in cell traction (Dujardin et al., 2003).

Our study permitted the observation of formation and maturation of contacts between cells and attachment sites during migration. Once protrusions reach the other side of the membrane, we observed a dense actin network to start forming at the edge around the pore into resembling a lamellipodia, described earlier as flat broad extensions

with a meshed actin network and actin-based attachment sites (Small et al., 1999b). The formation of actin spots at 1hr at the lamellipodia leading edge are also representative of actin-based adhesion complexes (Small et al. 1999a), and are in accordance with the time required for assembly of such structures in trypsinized fibroblasts (Dourdin et al., 2001). Adhesions in the form of focal complexes at the leading edge are typical of slow migrating cells such as fibroblasts, whereas rapidly migrating cells display very small submicroscopic adhesions (Ridley et al., 2003). Current evidence suggests that these structures act as precursors for focal adhesions (Rottner et al., 1999), a more complex type of adhesion seen in crawling cells, defined as dense actin structures at the end of long cell extensions marking the termini of stress fibers (Firtel et al. 2000). Observation of these latter structures at two hours suggests that such a transition occurs in this type of directed migration in 3D.

The restricted pores in this system could induce mechanical tension in the cytoskeleton by resisting nucleus translocation. Although deformable, the nucleus is less so than the cytoplasm (Yamauchi et al., 2005). Contrary to 2D and 3D models (Friedl and Bocker, 2000) of moving fibroblasts, the nucleus in our images is not at all centrally located in cells during migration, but lags behind until the very end, indicating difficulty in translocating. Nucleokinesis, or nuclear translocation, is mostly studied in dividing yeasts or fungi (Morris, 2000; Szabo et al., 2004) and remains poorly elucidated. Most studies suggest MT interactions with MF and cortical motor proteins as key elements in nuclear positioning (Starr et al., 2003; Xiang et al., 2004). In cell

migration, however, few studies have examined the way in which the nucleus moves within the cell and none in 3D. Most data on mammalian cells come from work on neurons that suggest MT in the leading portions of neurons are directly involved in nuclear movement by centrosome pulling and interactions with nuclear associated motor-proteins (Morris et al., 1998; Schaar et al., 2005). The narrowness of the environment inside the membrane pore makes it impossible here to identify the MTOC by β -tubulin labelling alone as in monolayer cells (Fig.5), however observation of the centrosome would be possible by labelling it with markers such as γ -tubulin or pericentrin. This is a limitation of the current study but the extensive network formation of MT and MF in front of the nucleus in the z axis, and the ensuing nearly perfect radial organisation of these networks towards the nucleus (still in the pore at 3 hours post-migration), suggests a similar form of active nuclear transport, possibly involving MF and MT. The 3D method with a relatively small pore size is therefore well suited for the analysis of nuclear translocation during migration, as pores create an artificial resistance to free nuclear translocation, hence possibly amplifying the processes involved in its active transport in physiological situations.

IFs are also involved in cytoskeletal crosstalk as new evidence implicates them in processes such as assembly of adhesion complexes (Gonzales et al., 2001) and in directed migration (Eckes et al., 1998, 2000). In contrast, an organized IF network was not observed in our study until cells had nearly completed migration across the membrane. This IF network formation is concordant with kinetic studies on trypsinized

cells (Prahlad et al., 1998; Helfrand et al., 2004), where a non filamentous juxtannuclear vimentin cap formed after 30 minutes and full network formation only at 3-4 hrs. Taken together, in a process involving physical forces, the actual complete migration of the cells in the absence of an organized network, similar to what could be seen by using a chemical disturbing agent, these data suggest that IF play no apparent role in this type of 3D migration. Our results are congruent with the 2D case as observed in the study using vimentin nul fibroblastic cells (Holwell et al. 1997).

The overall migration process through a 10 μm thick membrane points to another distinct feature and possible limitation of our study related to the geometry and short migration distance (10 μm) since cell translocation across the membrane occurs with only one cycle of the normally cyclical process that is to be coordinated seamlessly and continuously (Laffenburger et al., 1996). Stationary focal complexes at the leading edge of fibroblasts upon which the cell body and nucleus translocates and finally disassembles with the tail (Zamir and Geiger, 2001) were not observed in our system. Observations suggests rather that the initial focal complexes near the pores move away as cell edge progresses, extending radially from the pore, with no cell body translocation occurring over adhesions at any point. The general migration process in this type of 3D system could be divided into 3 overlapping phases, with the first step being the axial migration of the cell leading processes across the membrane. This would be followed by a radial migration on the under side of the membrane similar to cell spreading, with detachment of adhesions site nearest to the pores and new formation at the edge further on the

membrane (Helfang et al., 2004). Notably, filipodia can grow as long as 10 μm (Welch et al., 2002) and since this corresponds to the membrane thickness, it is possible that such structures could extend fully from either side of the membrane, adhere and move the cell across by successive traction from the spreading front, promoting the last phase of cell rear and nucleus translocation across the pore.

Conclusion

Optimized methodology has been developed to observe all three cytoskeletal networks and the nucleus in a time series of 3D migration across a porous membrane. Novel observations point to several differences compared to 2D migration, namely a pivotal role of MT in the 3D process and previously unobserved lag of nuclear translocation. This method can be further applied to observe relationships with cytoskeleton associated proteins in terms of location and associations within the cell motile machinery. Our study provides a tool that, together with live cell studies, molecular genetics and biochemical approaches, will aid in the quest to achieve an integrated view of directed migration processes under physiological conditions.

References

- Arcangeletti C, Sutterlin R, Aebi, U, De Conto F, Missorini S, Chezzi C, Scherrer K. 1997. Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and actin networks by "instantaneous fixation" preserving the cytoskeleton. *J Struct Biol* 119:35-58.
- Bacallao R, Kiai K, Jesaitis L. 1995. Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy. In: *Handbook of biological confocal microscopy*, ed. Pawley, JB. Plenum Presss, NY, pp 311-325.
- Baschong W, Duerrenberger M, Mandinova A, and Suetterlin R. 1999. Three-dimensional visualization of cytoskeleton by confocal laser scanning microscopy. *Methods Enzymol* 307:173-89.
- Blanc A, Tran-Khanh N, Filion D, Buschmann MD. 2005. Optimal Processing Method to Obtain Four-color Confocal Fluorescent Images of the Cytoskeleton and Nucleus in Three-dimensional Chondrocyte Cultures. *J Histochem Cytochem* 53:1171-1175.
- Berrios M, Conlon KA, Colflesh DE. 1999. Antifading agents for confocal fluorescence microscopy. *Methods Enzymol* 307:55-79.
- Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. 1997. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* 68:701-

707.

Chang L, Goldman RD. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:601-613.

Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD. 2006. Chitosan-Glycerol Phosphate-Blood Implants Increase Cell Recruitment, Transient Vascularisation and Subchondral Bone Remodeling in Drilled Cartilage Defects, submitted.

Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. 2001. Taking cell matrix to the third dimension. *Science* 294:1708-1712

DeMali KA, Burridge K. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci* 116:2389-97.

Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce J S, Huttenlocher A. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 276:48382-48388.

Dujardin DL, Barnhart L E, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, Vallee RB. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* 163:1205-1211.

Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delougee A, Kotliansky V, Babinet C, Krieg T. 1998.

- Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci.* 111:1897-1907.
- Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P. 2000. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci.* 113 : 2455-2462.
- Edmondson JC, Hatten ME. 1987. Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 7:1928-1934.
- Etienne-Manneville S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5:470-477.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol* 15:67-72.
- Firtel RA, Chung CY. 2000. The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays* 22:603-615.
- Friedl P, Brocker EB. 2000. The biology of cell locomotion within three dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:41-64.
- Geiger B, Bershadsky A. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13: 584-592
- Goldman RD, Chou YH, Prahlad V, Yoon M. 1999. Intermediate filaments: dynamic

processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. FASEB J 2:S261-5.

Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, Flitney FW, Jones JC. 2001. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. Mol Biol Cell 12:85-100.

Grinnell F. 2003. Fibroblast biology in three dimensional collagen matrices. Trends in Cell Biol 13:264-269

Hibbs, AR. Confocal microscopy for biologists : an Intensive Introductory Course. Victoria, Australia: Biocon. 258 p.,

Helfand BT, Chang L, Goldman RD. 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. J Cell Sci 117:133-141.

Herzog M, Draeger A, Ehler E, Small JV. 1994. Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton: double and triple immunofluorescence. In: Celis JE, editor. Cell biology. California: Academic press. p 355-360.

Hoemann CD, Hurtig M, Rossamacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. 2005. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. J Bone Joint Surg Am 87: 2671-2686.

Holwell T, Schweitzer SC, Evans RM. 1997. Tetracycline regulated expression of

- vimentin in fibroblast derived from vimentin null mice. *J Cell Sci* 110: 1947-1956.
- Hopwood D. 1967. Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *J Anat* 101:83-92.
- Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. 2002. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 278:72-83.
- Langelier E, Suetterlin R, Hoemann CD, Aebi U, Buschmann MD. 2000. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem* 48:1307-1320.
- Larsson L. 1988. Immunocytochemistry: Theory and practice, CRC press, Boca Raton, pp56-57, 160-162.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Lepisto J, Laato M, Niinikoski J, Lundberg C, Gerdin B, Heldin CH. 1992. Effects of homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF-AA and PDGF-BB) on wound healing in rat. *J Surg Res* 53:596-601.
- Martins GG, Kolega J. 2006. Endothelial cell protrusion and migration in three-

dimensional collagen matrices 63:101-115.

Morris NR. 2000. Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. *J Cell Biol* 148:1097-1101.

Morris NR, Efimov VP, Xiang X. 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* 8:467-470.

Nelson WJ. 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422:766-774.

Palecek J, Ubbels GA. 1997. Dynamic changes in the tubulin cytoskeleton during oogenesis and early development in the anuran amphibian *Xenopus laevis* (Daudin). *Folia Histochem Cytobiol* 35:3-18.

- Prahlad V, Yoon M, Moir RD, Vale RD, Goldman RD. 1998. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 143:159-170.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153:1175-1186.
- Robinson RW, Snyder JA. 2004. An innovative fixative for cytoskeletal components allows high resolution in colocalization studies using immunofluorescence techniques. *Histochem Cell Biol* 122:1-5.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 5:599-609.
- Rottner K, Hall A, Small JV. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9:640-648.
- Rozycki MD, Myslik JC, Schutt CE, Lindberg U. 1994. Structural aspects of actin-

binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6:87-95.

Rudert M. 2002. Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs* 171:229-240.

Shaar BT, McConnel SK. 2005. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *PNAS* 102:13652-13657.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553.

Small JV, Kaverina I, Krylyshkina O, Rottner K. 1999a. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. *FEBS Lett* 452:96-99.

Small JV, Furst DO, De Mey J. 1986. Localization of filamin in smooth muscle. *J Cell Biol* 102:210-220.

Small JV, Rottner K, Hahne P, Anderson KI. 1999b. Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 47:3-17.

Starr DA, Han M. 2003. ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J Cell Sci* 116:211-216.

Steinmetz MO, Goldie KN, Aebi U. 1997. A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J Cell Biol* 138:559-574.

- Szabo B, Kornyei Z, Zach J, Selmeczi D, Csucs G, Czirok A, Vicsek T. 2004. Auto-reverse nuclear migration in bipolar mammalian cells on micropatterned surfaces. *Cell Motil Cytoskeleton* 59:38-49.
- Vasiliev JM, Gelfand IM, Dominina LV, Dorfman NA, Pletyushkina OY. 1976. Active cell edge and movements of concanavalin A receptors of the surface of epithelial and fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4085-4089.
- Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* 15:76-83.
- Waterman-Storer CM, Salmon E. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 11:61-67.
- Waterman-Storer CM, Salmon ED. 1997. Microtubule dynamics: treadmilling comes around again. *Curr Biol* 7:369-372.
- Welch MD, Mullins RD. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:247-288.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Adrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160:267-277.

- Xiang X, Fischer R. 2004. Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41:411-419.
- Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, Tsuji K, Bouvet M, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. 2005. Real-time dual color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res* 65:4246-4252.
- Zamir E, Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114:3583-3590.

Tables

TABLE 6.1: Processing methods used to fix and permeabilize cells for cytoskeleton labeling.

Processing Methods	No	Preliminary Processing	Main Processing
Precipitating Agents			
Acetone/Methanol	1		Acetone :Methanol, 6 min
Cold Methanol	2		Ice cold methanol, 6min
Paraformaldehyde (PFA)			
Standard PFA Perm/Fix	3	4% PFA, 20 min.	0.5% Triton X-100, 15 min
Delayed PFA Perm/Fix	4	0.3% Triton X-100, 4 min	4% PFA, 20 min
Instantaneous PFA Perm/Fix 1	5		0.5% Triton X-100 / 1% PFA, 20 min
Instantaneous PFA Perm/Fix 2	6		1% Triton X-100 / 1% PFA, 20 min
Glutaraldehyde (GA)			
Smooth GA Perm/Fix 1	7	0.5% Octyl Poe / 0.125% GA, 5 min	1% GA, 20 min
Smooth GA Perm/Fix 2	8	2 % Octyl Poe / 0.125% GA, 5 min	1% GA, 20 min
Smooth GA Perm/Fix 3	9	0.5% Triton X-100 / 0.125% GA, 5 min	1% GA, 20 min
Smooth GA Perm/Fix 4	10	2% Triton X-100 / 0.125% GA, 5 min	1% GA, 20 min
Instantaneous GA Perm/Fix 1	11		0.3% GA / 0.1% Triton X-100, 20 min
Instantaneous GA Perm/Fix 2	12		0.5% GA/ 0.3% Triton X-100, 20 min
Mix of PFA/GA			
Instantaneous GA-PFA Perm/Fix	13		0.5% GA/ 0.3% PFA/ 0.3% Triton X-100, 20 min

% expressed as w/v for PFA and v/v for GA, Triton X-100 and Octyl Poe

TABLE 6.2: Probes and optical setup on Zeiss LSM 510 Meta C-Apochromat 40X/ 1.2 W objective.

Probe characteristics				Optical setup			
Probe	Labeled Component	Ex. Max, nm	Em. Max, nm	Wavelength Excitation Laser, nm.	Beam splitters	Filters	Pinhole, μm
Phalloidin Alexa 488	Actin (3 and 4 color)	497	520	488	MBS: HFT 488/543 DBS1: NFT 545 DBS2: NFT 490	BP 510/520	72
Primary Ab. Cy3	Vimentin (3 and 4 color)	552	570	533	MBS: HFT 488/543 DBS1: NFT 635 DBS2: NFT 545	BP 565/615	72
Toto-3	Nucleus (3 and 4 color)	642	660	633	MBS: HFT 488/543/633 DBS1: NFT 635 DBS2: mirror	BP 644/676	72
Secondary Ab. Alexa 405	Tubulin (4 color)	405	425	2 photons 800	MBS: HFT KP 650 DBS1: NFT 490 DBS2: NFT 490	BP 390/465	1000
Hoescht	Nucleus (3 color)	355	455	2 photons 780	MBS: HFT KP 650 DBS1: NFT 490 DBS2: NFT 490		1000

Ab.: antibody. MBS: primary beam splitter, DBS: secondary beam splitter, BP: band pass.

Figures and Figure Captions

Figure 6.1: Poor preservation and labeling of the cytoskeleton of BMSC in monolayer is obtained when processed with methods that are traditionally used in 2D light microscopy. Details of the processing methods are in Table 1 and the optical setup for this 3 color method (actin=green, vimentin=orange, nucleus=blue) is summarized in Table 2. (A) Cold methanol fixation (#2 Table 1) prevented actin labeling. (B) Delayed fixation (#4 Table 1) by applying 4% paraformaldehyde after 0.3 % Triton X100 permeabilization caused cells to detach from the substrate. (C) Standard fixation (#3 Table 1) with 4% paraformaldehyde followed by 0.5 % Triton X100 permeabilization yielded very faint labeling. Bar = 10 μ m.

Figure 6.2: Acceptable methods for 2D preservation and labeling of the cytoskeleton of BMSC in monolayer. Details of the processing methods are in Table 1 and the optical setup for this 3 color method (actin=green, vimentin=orange, nucleus=blue) is summarized in Table 2. Actin and vimentin at one optical section are shown separately followed by these two images superposed with the nucleus. All four of these methods where detergent is mixed with fixative yielded good preservation, labeling and detail for these networks when viewed in two dimensions. Numbers in parenthesis refer to processing method in Table 1. Arrows indicate actin dots. Bar = 10 μ m.

Figure 6.3: Cell height measurements for the assessment of 3D morphological preservation of processed BMSCs in monolayer. (A) X-Z view of an Imaris 3D

reconstruction of live BMSC stained with membrane lipophylic dye DiI. Cell height was assessed by distance measurements aligned with the Z-axis between points (arrowheads) on X-Z and Y-Z ortho slices. (B,C) Orthogonal views showing central X-Y plane flanked on the right by Y-Z plane and below by X-Z plane of a 3D stack of fixed cells labeled for actin (green), vimentin (orange) and the nucleus (red). (B) A well preserved 3D morphology can be appreciated in cells treated with the instantaneous GA method (#12) where maintenance of nuclear height is observed in X-Z and Y-Z planes. (C) In contrast flattened nuclei and cells are seen after fixation using the instantaneous PFA method (#5), although the two dimensional X-Y projection can appear highly resolved. A similarly flattened morphology was also observed with precipitating agents such as acetone/methanol. Bar = 10 μ m.

Figure 6.4: Cell height measurements on live cells (DiI) and after various fixation methods. Cell heights were measured using X-Z and Y-Z vertical sections of randomly selected cells. Cell flattening was also visually evident by simple observation. * $p < 0.05$ compared to DiI on live cells using Student's T-test. Numbers in parenthesis refer to processing method in Table 1.

Figure 6.5: Cytoskeleton and nuclear labeling using the 4 color method (details in Table 1) for BMSCs on glass coverslips and on polycarbonate membrane inserts. Cells were instantaneously perm-fixed with 0.5% Glut/0.3% PFA/0.3% Triton X100 (#13 in Table 1). Actin, vimentin and tubulin for one optical slice are shown separately followed on the right by their superposition with the nucleus. Stress fibers for actin, spread configuration

for vimentin and radiation from what appears to be the MTOC (arrows) for tubulin are clearly observable. In the bottom left image, the polycarbonate membrane was visualized using a fifth channel in transmission, and is seen as a dark gray background with discernable pores (arrowheads). Bar = 10 μ m.

Figure 6.6: Chemotaxis of rabbit BMSCs in response to hPDGF. Rabbit BMSCs were seeded onto polycarbonate membrane inserts with 8 μ m pores at 40,000 cells per insert. After 4 hours of incubation, non-migrated cells were removed and migrated cells were fixed on the membranes, stained and counted in 10 randomly selected fields for each well.

Figure 6.7: Time series of BMSC migration through a porous polycarbonate membrane in response to 50ng/ml hPDGF in a transwell insert. Membranes were fixed at the indicated times and mounted upside-down to illustrate the temporal progression of migration along the Z axis to the lower surface. Inserts were processed using the instantaneous perm-fix with 0.5% Glut/0.3% PFA/0.3% Triton X100 and then labeled for actin (green), vimentin (yellow), tubulin (false color magenta) and the nucleus (red). The lower surface of the membrane was imaged by CLSM and pores (white as indicated by the arrow) were also imaged in nonconfocal transmission mode. After 30 minutes of migration, actin and tubulin are both seen on the migrated side to be leading cell progression through the filter. Vimentin is also visible in some pores, but only as a loose network in the center of the pores that is not attached to the pore wall. Migration progresses steadily and at 3 and 4 hrs, cells have attained a typical monolayer

morphology with spread bipolar morphology, actin stress fibers and a large and relatively central nucleus. Bar = 10 μm .

Figure 6.8: Cytoskeletal organization and distribution in 3D for BMSCs migrating through porous polycarbonate membranes membrane in response to 50ng/ml hPDGF in a transwell insert. Membranes were fixed at the indicated times using the instantaneous perm/fix (#13 in Table 1) with 0.5% Glut/0.3% Para/0.3% Triton X100 and then labeled for actin (green), vimentin (yellow), tubulin (false color magenta) and the nucleus (red) and mounted upside-down to illustrate the temporal progression of migration to the lower surface along the Z axis. Membrane pores were visualized in nonconfocal transmission mode (white). Orthogonal views are shown with the central X-Y plane flanked on the right by the Y-Z plane and below by the X-Z plane taken from 3D stacks of representative cells on the membrane. X-Y images are projections of superposed sections including that part of the cell that has emerged on the underside of the membrane, for a total thickness indicated by the small parallel white lines in the X-Z and Y-Z views in the lower right corner of each image. Yellow arrows indicate the direction of migration for both X-Z and Y-Z planes of the orthogonal view. Actin and tubulin filaments are the earliest to traverse the membrane, seen clearly at 30 minutes. Dense actin bundles are clearly visible at 1 and 2 hours from various perspectives (white arrows). At 2 to 3hrs, the cytoskeleton begins to radiate outwardly from the pores, and depict the cell pulling on its nucleus, which characteristically is the last to migrate through the pore. At 4 hrs, most of the nuclei have traversed the pores. Bar = 10 μm .



Figure 6.1

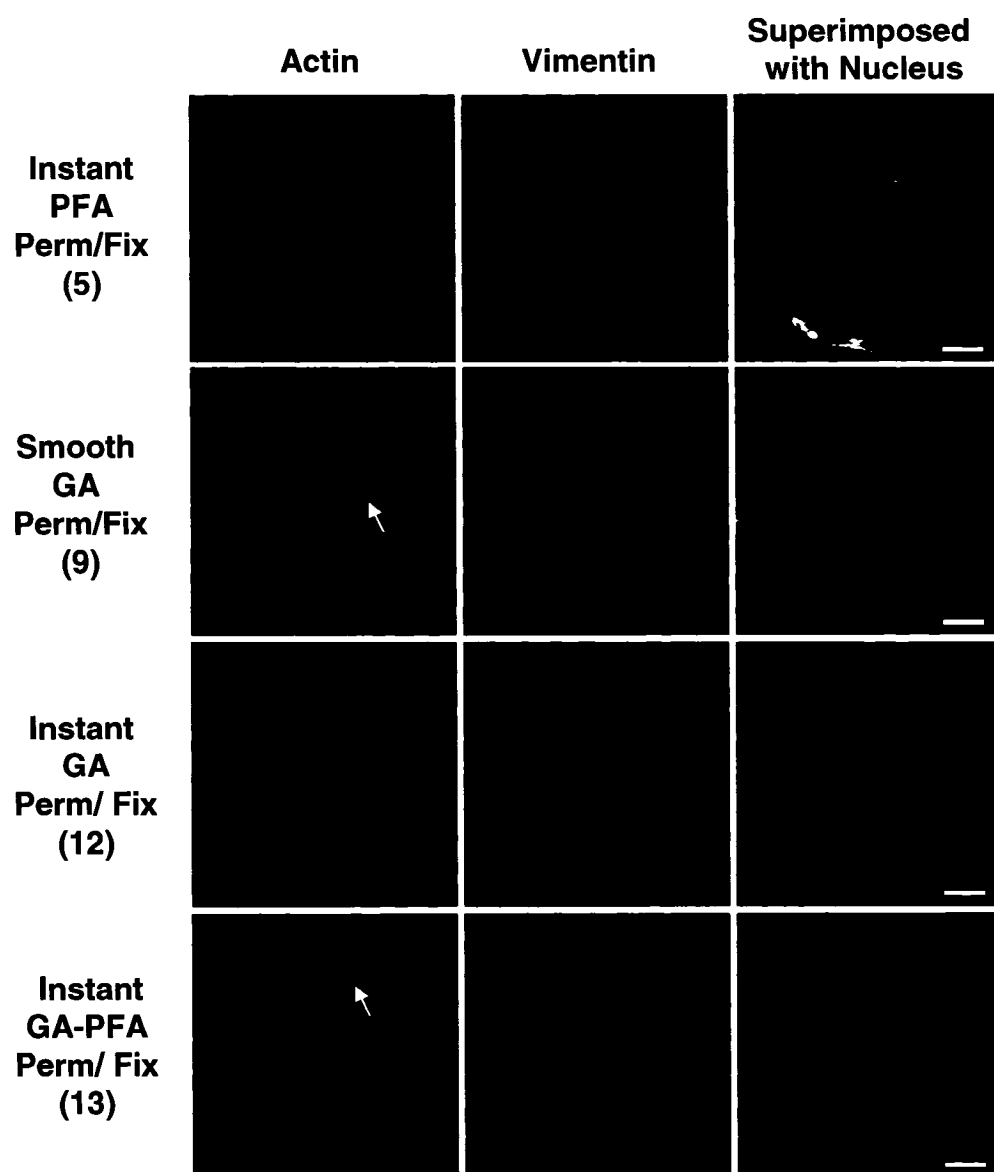


Figure 6.2

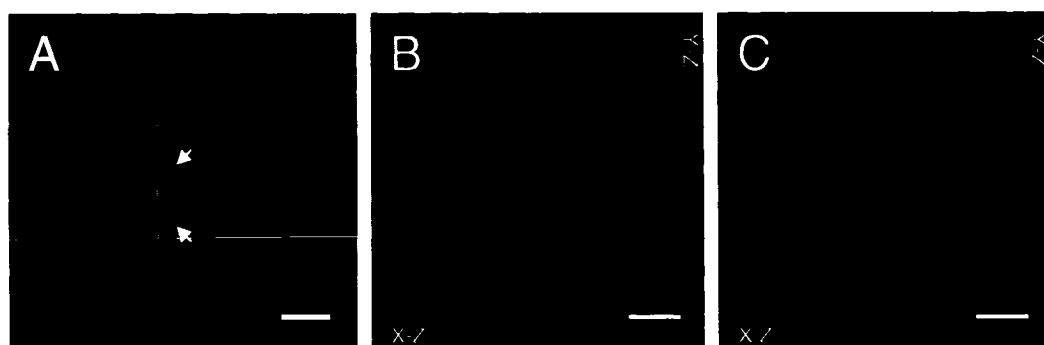


Figure 6.3

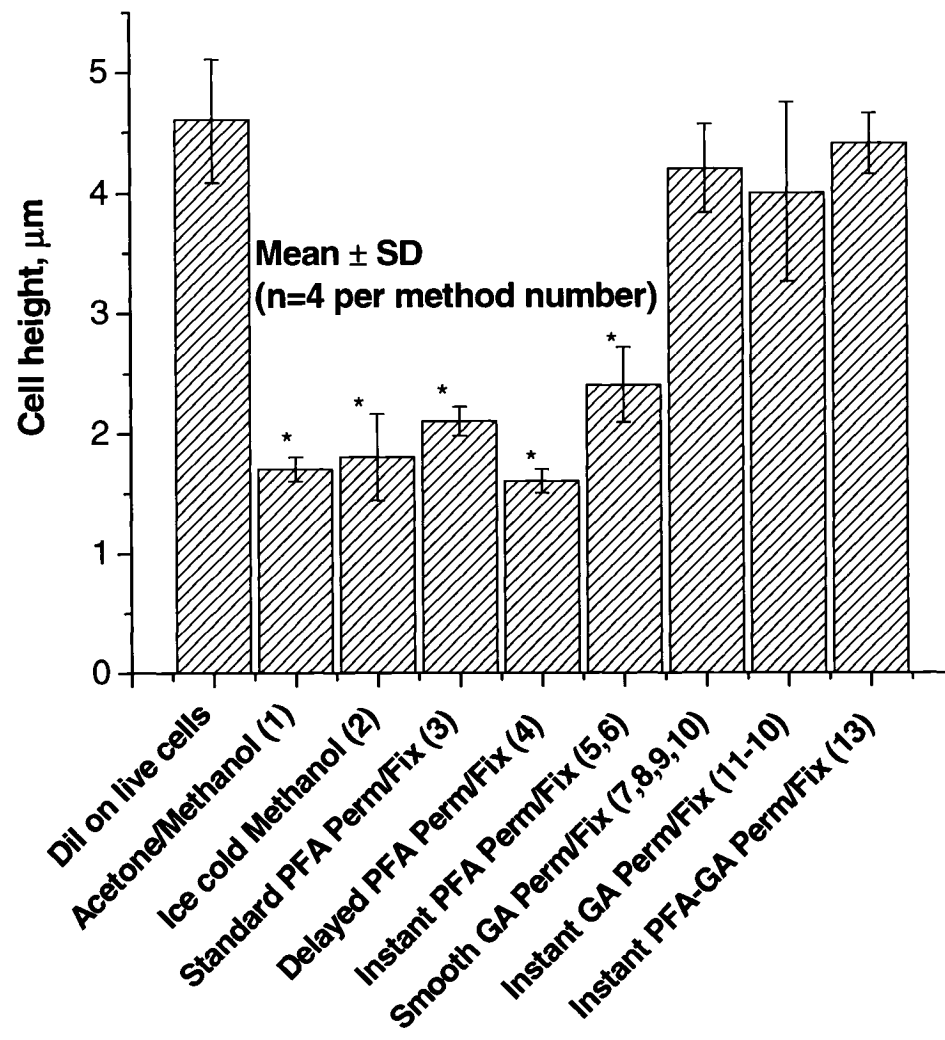


Figure 6.4

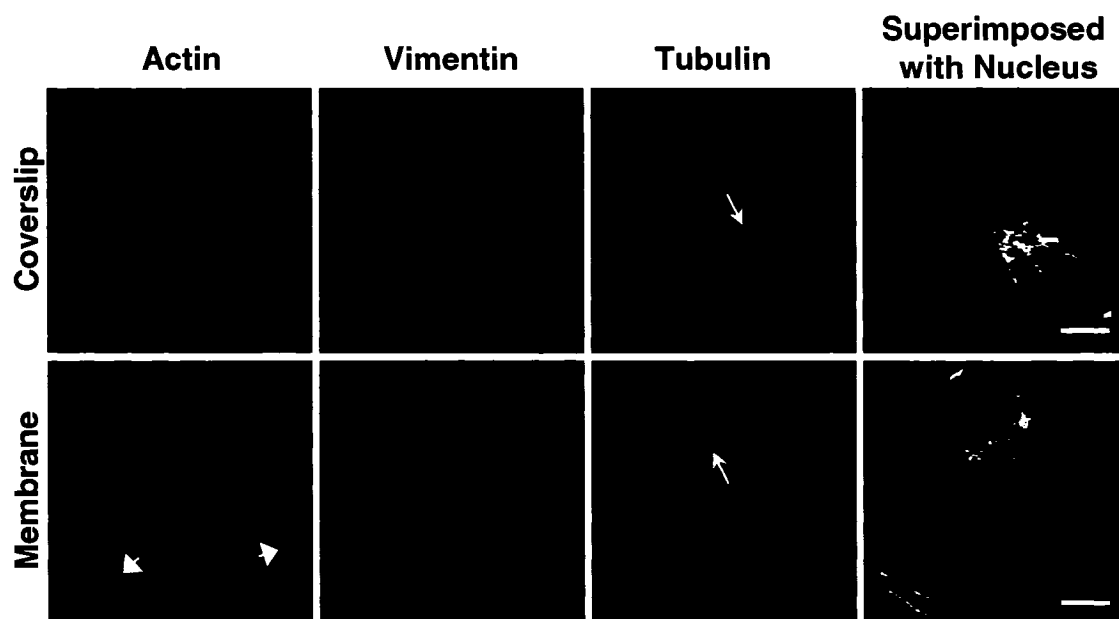


Figure 6.5

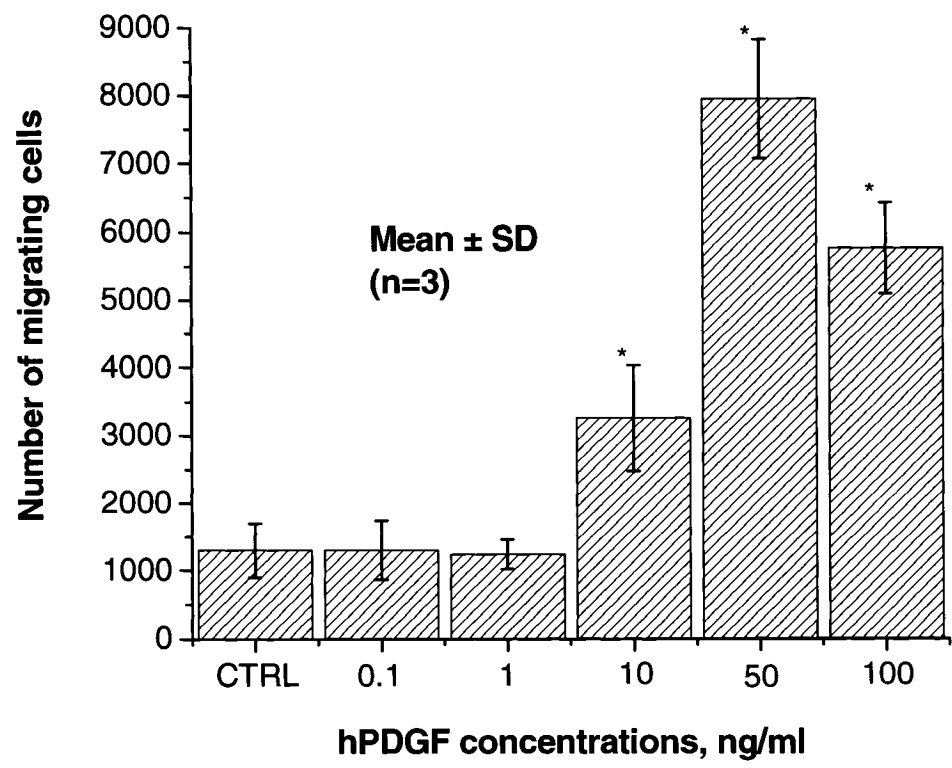


Figure 6.6

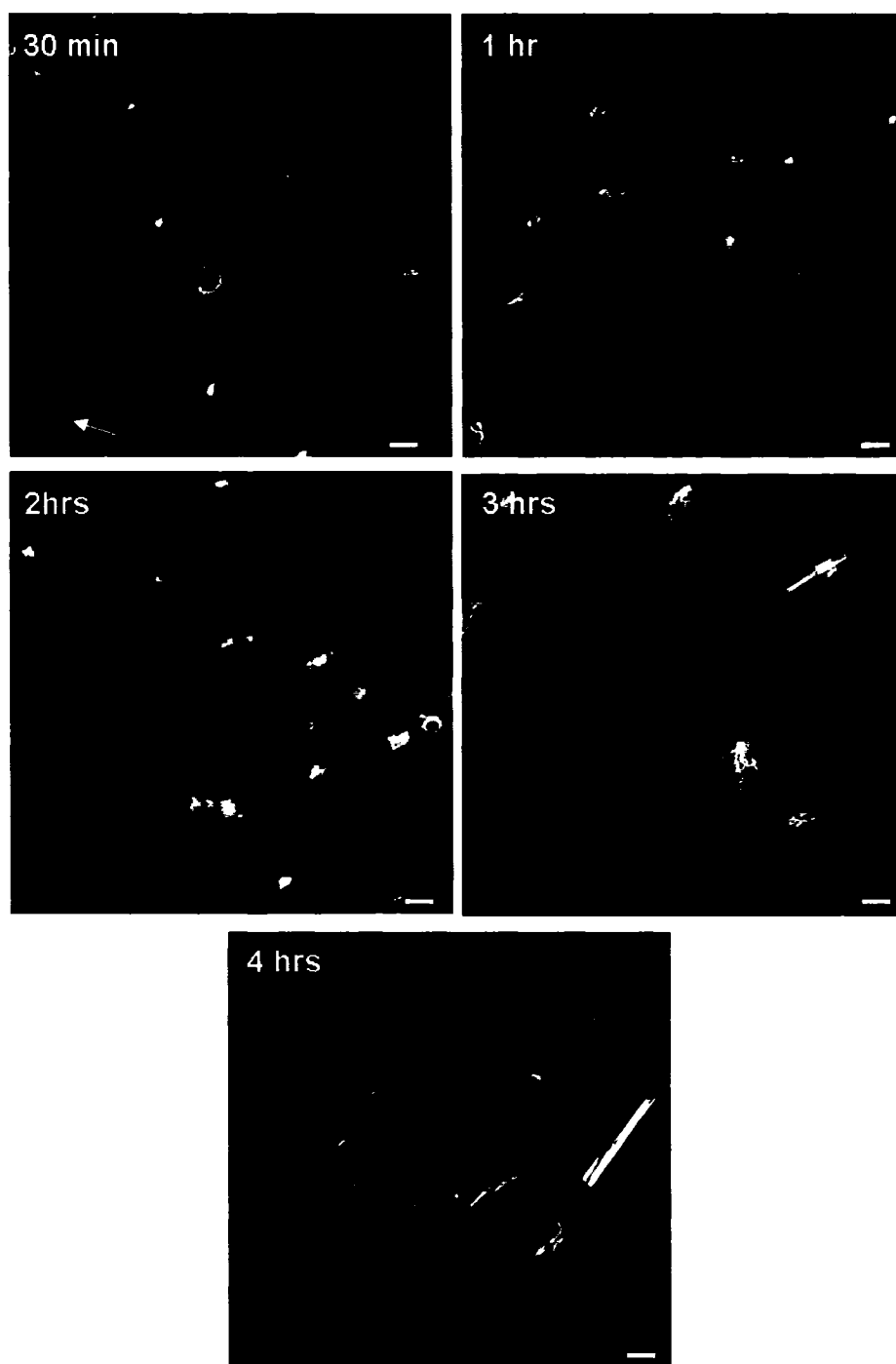


Figure 6.7

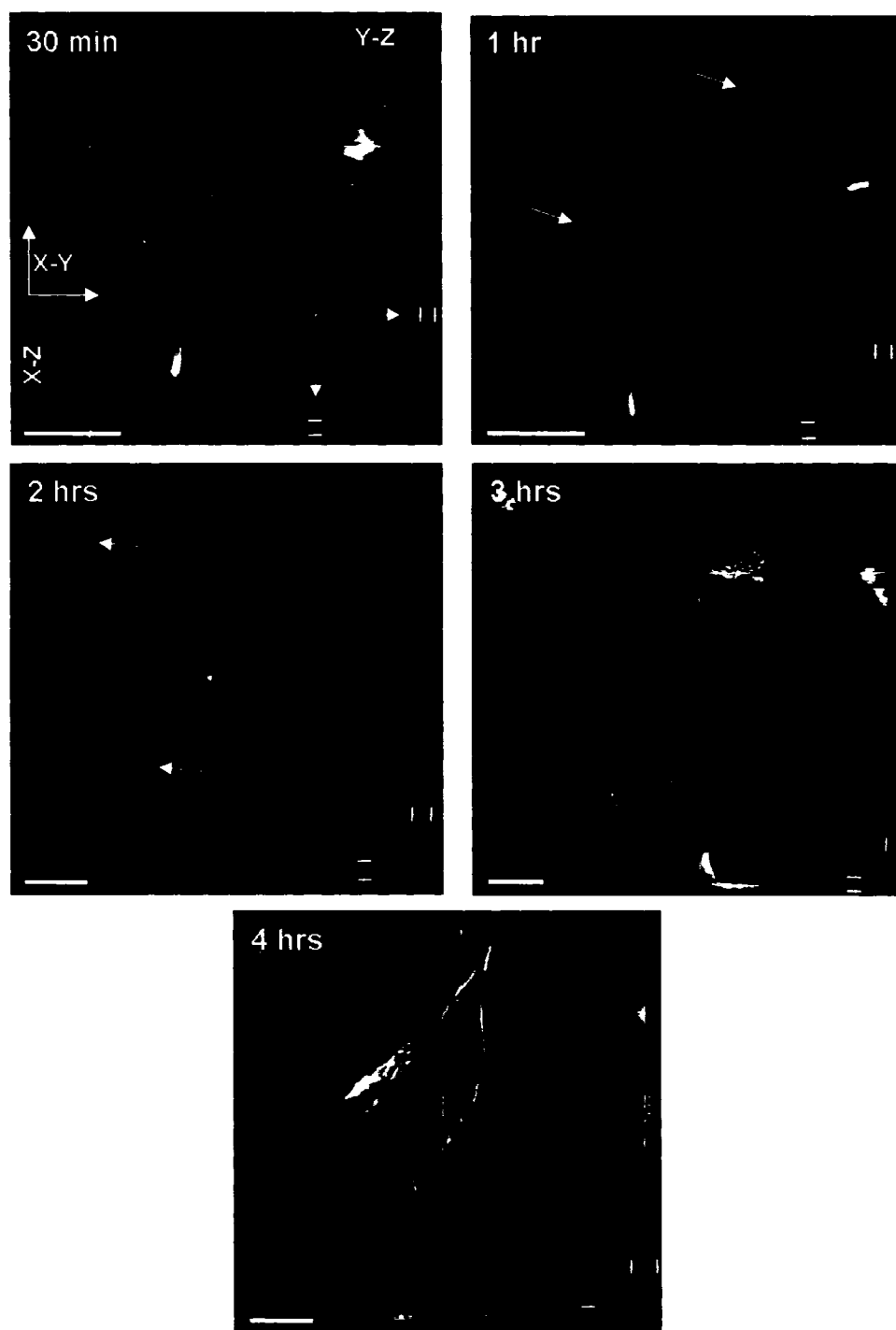


Figure 6. 8

CHAPITRE 7. Fibronectin, Vitronectin and Collagen I Induce Chemotaxis and Haptotaxis of Human and Rabbit MSC in a Standardized Transmembrane Assay

Abstract

The mesenchymal stem cell (MSC) is a critical element in tissue repair and regeneration. Its ability to differentiate into multiple connective tissue cell types and to self-renew has made it a prime candidate in regenerative medicine strategies. Currently, the environmental cues responsible for in situ recruitment and control of MSC distribution at repair sites are not entirely revealed and in particular the role of extracellular matrix (ECM) proteins as motogenic factors has not been studied. Here we have used a standardized transmembrane chemotaxis assay to assess the chemotactic and haptotactic potential of fibronectin, vitronectin and collagen type I on MSC from both rabbit and human origin. The use of both cell types was based in part on the widespread use of rabbit models for musculoskeletal related tissue engineering and repair models and their unknown correspondence to human in terms of MSC migration. The optimized assay yielded a greatly increased chemotactic response toward known factors such as PDGF-BB compared to previous studies. Our primary finding was that all three ECM proteins tested (fibronectin, vitronectin and collagen I) induced significant motogenic activity, in both soluble and insoluble forms, for both rabbit and human MSCs. These results suggest that ECM proteins could play roles as significant as cytokines, in the

recruitment of pluripotential repair cells wound and tissue repair sites. Furthermore designed ECM coatings of scaffolds or implants could provide a new tool to control both cell influx and outflux from the scaffold post-implantation. Finally, the similarity of motogenic behavior of both rabbit and human cells suggests the rabbit is a reliable model for assessing MSC recruitment in repair and regeneration strategies.

Keywords : vitronectin, fibronectin, collagen, chemotaxis, haptotaxis, TGF, PDGF, FGF, mesenchymal stem cells, cell motility

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) of the bone marrow are multipotential stem cells capable of differentiation into numerous connective tissue lineage including fibroblasts, chondrocytes, osteoblast, adipocytes and myoblasts (1, 2). Musculoskeletal wound healing at sites contiguous to the marrow is thought to involve the recruitment, commitment and differentiation of MSC into the tissue-specific phenotype (3, 4), similar to that which occurs in embryonic skeletal development. These characteristics, together with their ease of isolation and capacity to undergo extensive replication in vitro, have made MSC prime candidates for cell-based tissue engineering approaches that have been studied extensively (5). Furthermore, recent report suggests that MSC may have a broader plasticity than previously thought, and be of interest for regeneration of other organs, such as the brain and heart (6, 7).

Although recent evidence supports the presence of circulating bone marrow derived MSC participating in distant wound healing, their concentration in the circulation is believed to be very low and their plasticity not yet fully unveiled, with reports suggesting osteogenic (8) and fibroblastic commitment (9). Thus in regenerative medicine, two options remain evident to obtain sufficient cell numbers at the wound site, either local recruitment of host cells or delivery of cells ex vivo. Both approaches typically involve scaffold-based bioengineering where cell recruitment can be achieved by release of chemotactic agents from migration-conducive scaffolds (10, 11) , or ex

vivo cells can be directly transplanted within a scaffold as delivery vehicle (5, 12). Local scaffold-based recruitment of stem cells is a simpler approach from a regulatory and manufacturing standpoint to facilitate eventual clinical implementation on a wide scale, however the mechanisms by which MSCs in the bone marrow stroma leave their primary sites and move through matrices to secondary sites, distant or contiguous to the marrow, are not well understood (13). At sites of injury, directed migration is thought to be mediated largely by soluble factors released from platelets and other cell types, sustaining chemotaxis, or movement of cells up a gradient of soluble factors (14). The binding of these factors to membrane receptors initiates a series of intracellular molecular events leading to the reorganization of the cytoskeleton into a locomotive machinery (15). Whilst many soluble cytokines (16-21) and chemokines (22) have been recently identified as chemotactic for MSC, much less is known about the directed motogenic activity elicited by extracellular matrix (ECM) proteins, in soluble or insoluble substrate-bound gradients, on MSCs.

ECM–cell interactions are fundamental to the control of cell distribution and cell organisation in processes such as development and wound repair (23). Binding of cells to ECM initiates a signal transduction cascade that mediates cell adhesion, proliferation, differentiation and migration (24). In migration, it is the traction exerted on the ECM by the cells through integrin receptors that permits movement (25). Cells also have the ability to move up an adhesive substrate-bound gradient of ECM proteins, in a process termed haptotaxis, which is believed to be involved in metastasis (26), and wound repair

(14) and has been proposed as tool for cell guidance in tissue engineering (27, 28). Certain ECM components including fibronectin (Fn), vitronectin (Vn) and collagen I (Col1) play important roles in wound healing processes (29) while in vitro, they have been shown to induce substrate adhesion or migration for wound healing cells that include neutrophils, macrophages, fibroblasts and endothelial cells but not yet MSCs (14, 30-33). Integrins specific for Col1 ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$), Vn ($\alpha5\beta3$) and Fn ($\alpha5\beta1$) are also expressed by MSCs (34), and these three ECM proteins have been demonstrated in vitro to modulate MSC attachment and phenotype (35, 36). Their attachment properties have also been put to use in implant design (37), demonstrating that scaffold-based modulation of MSC attachment and phenotype can be achieved by adsorption of serum Vn, Fn and Col1. Despite these results and the growing interest in MSC for tissue repair, the ability of these Vn, Fn and Col1 to induce directed migration of MSCs has never been tested.

In this study we hypothesized that Fn, Vn and Col1 are motogenic for MSCs and can direct cell migration by chemotaxis and haptotaxis. We have analyzed and compared cell migration indices for MSCs from rabbit and human in an optimized transmembrane assay, providing insights into interspecies differences and similarities. Rabbit MSCs were chosen based on the widespread use of rabbits models for joint degeneration and repair (38), and on the relative incomplete information on rabbit MSC behavior in vitro. Although rabbit MSC markers are not commercially available, in contrast to human and mice markers, rabbits are a model of choice for testing numerous regenerative strategies

involving scaffolds with or without MSCs in previous studies (12, 39-41) that suggest a significant role of MSCs in the repair response. The parallel use of rabbit and human cells was judged necessary based on previous literature suggesting interspecies extrapolation to be misleading. The in vitro variability of phenotype markers such as alkaline phosphatase production and osteoinduction potential comparing MSC from different species can be significant (42) as can chemotaxis comparing mice/rat (17, 43, 44) and human (16) MSC, using conserved factors such as TGF β 1 and FGF-2.

The cytokines TGF β 1, FGF-2 and PDGF-BB are important regulators of the spatio-temporal distribution of cells in the wound (45) and have been widely studied on various cells. Nonetheless, studies with mesenchymal cells that bear the cognate receptors (46), have reported conflicting results concerning motogenic properties, some of which can be accounted for by the use of different species, as mentioned above, but also possibly due to a lack in standards in the procedures to assay cell migration (47, 48). The in vitro transmembrane chemotaxis assay (TCA), also named the modified Boyden chamber assay, is the assay of choice for identifying pro- or anti-motogenic compounds (49). Based on preliminary results in our lab and reports showing strong methodology-induced variability in motogenic behavior of cells (47, 48), we also hypothesized that this assay could be optimized to increase its resolution by examining parameters such as the use bovine serum albumin (BSA) in buffers, membrane coating, pre-migration cell attachment time as well as type of fixation and cell starvation prior to migration. We then used this standardized and optimized procedure to investigate the motogenic

activity of ECM proteins on MSCs.

Methods

Rabbit Bone Marrow Derived MSC Isolation

Cells were isolated from the bone marrow of rabbits as reported earlier (50). Femurs from two New Zealand White Rabbits weighing between 3 and 4 kg were used separately. To isolate femurs, both legs were first shaved from the tarsal joint to the hip using an Oster Animal Clipper with a size 40 blade set. Femurs were dissected aseptically from the joint and placed in sterile HBSS-FBS (Hanks Buffered Salt Solution from Invitrogen, Carlsbad, CA, supplemented with 10 mM HEPES, 2% Fetal Bovine Serum, 100 units Penicillin and 0.1 mg Streptomycin /mL) on ice. The femurs were then cut open at both epiphysis with a bone cutter and flushed with 10 ml syringes containing HBSS-FBS into a 100 mm Petri dish. A dispersed bone marrow cell suspension was then prepared by repeated pipetting of the cell suspension with decreasing size needles, from 18g to 23g and the suspension filtered through a 70 μ m sterile steel mesh to remove remaining particulates of fat or bone and centrifuged and washed two times in HBSS-FBS. Contaminating erythrocytes were lysed in a 1 ml aliquot with 0.14 M ammonium chloride and remaining cells counted in a hemocytometer and seeded at 10^7 cells per 100 mm Petri dish. BMSCs used in this study were then purified by simple adherence and identified as such on the basis of their clonogenic proliferation and fibroblast-like morphology (51). Cells were propagated in 25 cm² culture flasks for colony forming

efficiency (CFE) analysis. Colony forming efficiency (CFE) was estimated by fixing cells in the flask at day 14 using methanol for 10 min, staining with Toluidine blue (1% w/v in PBS) for 5 min and counting colonies under a dissecting microscope (data not shown). Culture media was DMEM low glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with fresh 10% FBS (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 100 units Penicillin and 0.1 mg Streptomycin /mL (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Human Bone Marrow Derived MSCs

Human bone marrow derived MSC cell lines from 2 healthy consented donors (1 male, 1 female) were purchased from the Tulane Center for Gene Therapy (Tulane, LA, USA) as -80°C frozen vials of pathogen-screened passage 2 primary cells. Research on human-derived cells was carried out using institutional ethics-approved protocols. According to the supplier, cells were characterized by flow cytometry demonstrating expression of cell surface markers CD44, CD90, CD166, CD49b, CD105, CD29, CD48c, CD147, CD59 and lack of expression of CD34, CD36, CD45 and CD117. Human cells were cultured in non-differentiating medium consisting of Alpha MEM (Invitrogen Carlsbad, CA) with 4 mM L-glutamine supplemented with 15% lot-selected FBS (Atlantic Biologics, Atlanta, GA), 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Both human and rabbit MSCs were grown in a 5% CO₂-atmosphere at 37°C and the medium was renewed every 3 days. Cells were sub-cultured at logarithmic phase growth before confluence, by trypsin-EDTA detachment. Cells from both human donors were used before the 9th passage while those from rabbit

were used before the 13th passage.

Chemotaxis Assay Optimisation and Analysis of ECM Chemottractants on MSCs

Cell migration assays were performed using the in vitro transmembrane chemotaxis assay (TCA), with a modified Boyden chamber having a 6.5-mm diameter, 10- μ m thick, porous (8.0 μ m pores) polycarbonate membrane separating the two chambers (Transwell[®]; Costar, Cambridge, MA). In an effort to scale down the use of expensive recombinant growth factors, we also employed a reusable 96 well migration chamber from Neuroprobe (but not the commonly used and simpler to handle 48 well chamber), however this yielded a marked decrease in total migration (30%, not shown) and in reproducibility (not shown) and is not suggested.

Cell growth phase and starvation: Only log-phase cells were used for migration experiments. Cells were starved in 0.5 % serum for 24 hrs prior to the assay (52). Although we have not tested the effect of starvation in all experiments, our observations with PDGF suggest that starvation increases the reproducibility of the assay, without necessarily increasing the maximum response or the level of migration in controls (not shown). Considering the variability in serum composition between lots, and in the concentration or type of serum used for each cell type in different studies, the elimination or decrease of serum amount prior to in vitro functional studies could render outcomes more reproducible and uniform, facilitating comparison between studies.

Cell detachment: In order to minimize the effect of trypsin mediated cell

detachment, an enzyme-free cell dissociation solution (Invitrogen, Carlsbad, CA) was tried on ice, but without success. Instead, plated cells were washed twice in this cell dissociation buffer prior to adding 0.05% trypsin, which decreased the exposure time necessary for cell detachment from ~5 min (when PBS was used for pre-washes) to under 60 sec. This detachment method was used for all migration experiments. Soybean trypsin inhibitor (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) in 15% FBS-supplemented media was then added to stop the reaction. Cells were spun and washed in serum free media with soybean inhibitor and finally resuspended at 500,000 cells/ml in migration media consisting of the basal media appropriate for each cell type as mentioned above, but only with antibiotics as supplement and without FBS. Cells remained in this media inside polypropylene tubes for 30 min prior to migration.

Cell loading onto inserts: Inserts were pre-warmed at 37° C inside incubators 1 hr prior to adding cells. Chemoattractants (600 ul) added to the bottom chambers included human platelet-derived Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFβ1, R & D System, Minneapolis, MN) suspended in 4 mM HCl, 0.1% BSA at 10 µg/mL (400 nM) and stored as aliquots at -80°C, human recombinant basic Fibroblast Growth factor-2 (FGF-2, R&D Systems, Minneapolis, MN), human recombinant Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB, R&D Systems, Minneapolis, MN) and purified cell culture tested Fibronectin (Fn, Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada, product # F4759), Vitronectin (Vn, Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada, product # V9881) and soluble collagen 1 (Coll1, Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada, product # C8919). All chemoattractants

were serially diluted to the specified concentration in the same media in which cells were suspended for the assay.

For experiments evaluating the effect of pre-migration cell attachment time, 50,000 cells/well were placed in the upper well of migration inserts and incubated for 0hr, 1hr or 2hrs before gently adding 600 μ l of chemoattractants to the bottom chambers. Cells were not disturbed since the bottom wells of this system are accessible without removing the cell-containing inserts. Negative controls in all experiments consisted of filling the bottom chambers with the same media in which cells were seeded in the upper chambers. Chemokinesis, or random cell migration toward homogeneous concentrations of soluble factors, was tested for all agents by placing the same concentration of chemoattractant in both upper and lower chambers.

Membrane coating for haptotaxis: For experiments investigating haptotaxis, the underside of the membrane was coated by floating the inserts on 600 μ l solutions of cell culture tested Fn, Vn or Coll in sterile phosphate-buffered saline, pH 7.4 placed in the bottom chamber overnight at 4°C. Excess ligand was removed by blotting, and inserts were air-dried upside down inside sterile hood for 1 hr before being rinsed 4 times in sterile PBS, and then used the same day for migration experiments. Concentrations used for coating were the same as in the chemotaxis experiment, which are in the range of other studies using similar methodology for non-MSCs (52-55).

Membranes were coated on both sides for haptotaxis negative controls

(haptokinesis) by placing ECM protein solutions in both lower and upper chamber, using the concentrations eliciting maximum response for haptotaxis found in the above experiments, i.e. 20 $\mu\text{g/ml}$ for fibronectin, 10 $\mu\text{g/ml}$ for vitronectin, and 25 $\mu\text{g/ml}$ for collagen I in sterile phosphate-buffered saline, pH 7.4, and incubated overnight at 4°C. Coated inserts were also used to test the effects of substrate coating on PDGF-BB chemotaxis at 1 ng/ml. In this case, both sides of the membrane were coated with Fn, Vn and collagen I as described above. We also coated the membranes with gelatin at 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada) and hyaluronic acid (Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada) at 5 mg/ml and BSA at 1 mg/ml (Sigma Aldrich, Oakville ON, Canada) all prepared in sterile PBS.

Cell fixation: After 4 hrs of incubation, non-migrated cells on the upper surface of the membrane were scraped off with a cotton applicator and the migrated cells on the bottom surface were fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 10 min at room temperature. Other fixatives including absolute ice-cold Methanol (10 min) (43, 49), 4 % paraformaldehyde (w/v) in PBS (10 min) (18) and 70 % ethanol (v/v) (2 min) (56) were also tested for their effect on final migrated cell count. Once fixed, cells were stained with toluidine blue 1% (w/v) for 4 min, excess dye was gently removed by capillarity and inserts air dried upside down for at least 1 hr at room temperature before cell counting.

Cell counting: The number of stained cells/well was counted with an inverted microscope by placing the insert on a grid-bearing coverslip (Carl Zeiss, Toronto, ON,

Canada) at 200X or 400X magnification, depending on cell density. Random fields (4 for 20x observations and 16 for 40X observations) of view covering an area representing about 8-10 % of the filter surface area were analyzed and cell counts averaged and extrapolated for the entire area of the filter by multiplying by the ratio between the area of fields of view and the entire insert (0.33 cm^2) i.e. 42.3 for 20X and 165 for 40X. We noted a significant increase in homogeneity of migration across the surface of each filter with the optimized procedure. Results were expressed as the percentage of total cells that migrated given the initial 50,000 total cells seeded. Cell migration was then also expressed as the Chemotactic Index (CI), consisting of the ratio of migrated cells for a particular chemoattractant to the control without chemoattractant. Since control migration was negligible, % cell migration was found to be more descriptive, however CI was retained to compare with other studies.

Statistical analysis

All experiments were performed in duplicate with at least two separate experiments, using cells from different donors for each experiments (N=4), except as otherwise noted in figure legends. Results are presented as Mean \pm Standard Deviation (SD). Statistical significance was assessed by the Student t-test with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results

Rabbit Bone Marrow Derived MSC Characterization

Adherence purified rabbit bone marrow MSCs had fibroblastic morphology with good adherence and colonies varying in size at 14 days post-isolation. As described previously (50), the cytoskeleton displayed the expected organization for bone- marrow derived MSC, including hallmark actin stress fibers and vimentin morphology similar to fibroblast-like phenotypes (data not shown). Colony forming efficiency (CFE), the estimated colony number per inoculum, was estimated at 2×10^{-6} with an inoculum of 10^7 cells (data not shown), consistent with other studies with rabbit cells (51). Cells derived from these colonies were used in experiments for optimization of the chemotaxis assay.

Optimization of the Transmembrane Chemotaxis Assay

We initially examined the effect of attachment time used to allow MSC to settle and adhere to the membrane before establishing a gradient of soluble chemoattractant (57, 58). When no pre-migration cell attachment time was allowed before adding the chemoattractant in the bottom chamber, 20% of all rabbit BMSCs migrated towards 10 ng/mL PDGF-BB during 4 hours (Fig 1A). Pre-attachment of cells for 1 or 2 hours reduced migration by 40% to 60%, respectively, with only 11.7% or 7.8 % cells migrated after 4 hours (Fig. 1A). With cells allowed to immediately migrate, we tested the effect

of BSA at concentrations of 1% w/v or 0.1% w/v in the buffers for PDGF-BB-induced chemotaxis, a procedure that is widely used in chemotaxis studies. The use of BSA-supplemented media decreased cell migration significantly ($p < 0.05$) by about 65% and 90 %, for 0.1 % and 1% BSA solution in either chamber, respectively. The average total migrated cells was 6.8 % when 0.1% BSA was used and 1.3 % when 1% BSA was used (Fig.1B), as opposed to nearly 20% migration without BSA. Altogether, these data revealed that optimal migration (20% of total cells) over controls towards PDGF-BB was obtained with no pre-attachment and omission of BSA.

The method to fix cells prior to staining and counting them is yet another source of variation among chemotaxis studies (16, 43, 56). We found that methanol and paraformaldehyde methods of cell fixation reduced total counts of migrated cells to 10 ng/ml PDGF-BB by about 40% while 70% ethanol had no effect compared to glutaraldehyde (Table 1). Fixative choice could play a role due to the fact that cells that have just migrated have relatively weak adhesions to the substrate (25) and be prone to disruption under sub-optimal fixation. We have shown that various non-glutaraldehyde fixatives perturb the cytoskeleton and provoke cell detachment from these membranes (50). Based on these results, all migration experiments were performed with no pre-migration attachment time, no BSA added, and with glutaraldehyde as fixative. Time of migration was based on a previous report showing complete cell body translocation across the membranes for all cells at 4 hrs (50).

PDGF-BB Induced Chemotaxis

PDGF-BB induced a strong chemotactic response for both rabbit and human cells, but to different levels and with a different dose-response. The PDGF-BB minimum dose to detect a significant migration was 0.1 ng/ml for both cells (Fig. 2A), an optimal 25% migration of rabbit MSC was observed at 25 ng/mL, while human MSC chemotaxis reached an optimal maximum at 10 ng/ml with about 15 % migrated cells at 4 hours. Although rabbit MSCs cells migrated in greater numbers for all doses, the CI for both species were very similar since migration in control samples was higher in rabbit than human MSCs. Rabbit cells in general displayed greater motility, but not necessarily an increase in chemotaxis, where both species behaved similarly. Chemokinesis controls performed with 1 and 10 ng/ml PDGF-BB in both chambers did not increase migration compared to control, indicating cell migration was truly chemotaxis in the presence of a gradient of soluble PDGF-BB, rather than chemokinesis.

In contrast to PDGF-BB, both TGF β 1 and FGF-2 had no chemotactic activity (Fig. 2, B&C) on MSC from rabbit or human, at concentrations ranging from 0 to 50 ng/ml for TGF β 1 and 0 to 1000 ng/ml for FGF-2. Such high concentrations for FGF-2 were used based on a previous study with mice MSC which showed low-level chemotactic activity at 300 ng/ml FGF-2 (17).

ECM Proteins Induced Chemotaxis

Fn, Vn, and Coll all induced a dose-dependent chemotaxis of rabbit and human

MSC. At concentration optima ranging from 10 to 25 $\mu\text{g/mL}$, these soluble matrix proteins elicited between 8% to 12% of total cells migration. The minimum dose of Fn to induce significant migration ($p < 0.05$) was 10 $\mu\text{g/ml}$ and the maximum response was at 20 $\mu\text{g/ml}$ for both rabbit and human cells (Fig. 3). Although less potent than PDGF-BB, Fn induced the strongest chemotactic response in terms of percentage migrated cells in both human and rabbit, with CI also the highest but in rabbit cells only. With Fn, the rabbit MSC response was stronger than human, in both absolute (%) and relative (CI) terms, although global dose-dependence behavior was similar. The minimal concentration of Vn for significant chemotaxis ($p < 0.05$) was 1 $\mu\text{g/ml}$ and the maximal migration occurred at 10 $\mu\text{g/ml}$ for both species and CI behaved similarly. In the case of Coll, rabbit and human MSC once again responded similarly, with a minimal dose of 5 $\mu\text{g/ml}$ necessary to induce significant chemotaxis, and with a maximum in chemotaxis at 25 $\mu\text{g/ml}$. Both rabbit and human MSCs showed a rapid drop in chemotaxis at 100 $\mu\text{g/ml}$. Only Coll elicited a stronger response in human compared to rabbit, in both absolute and relative terms.

Chemokinesis (ck) was tested for each cell type with the respective optimal concentration for each matrix protein chemoattractant placed in upper and lower chambers. Fn and Coll chemokinesis controls showed a slight increase in migration compared to control (by about 2 \times), although not statistically significant. These results show that ECM proteins elicit a genuine chemotactism for both rabbit and human MSCs. The lowest concentration of matrix protein required to attract MSC was for vitronectin

followed by fibronectin that was followed by collagen type I.

ECM Protein Induced Haptotaxis

Rabbit and human bone marrow derived MCSs migrated in a concentration-dependent manner over substrate-bound ECM proteins in the absence of soluble chemoattractant (Fig.4). Dose-dependence was similar to that for chemotaxis towards each soluble ECM component, such that minimal doses of attached factors were needed to induce movement. As many as 25% of all rabbit MSCs migrated to insoluble Fn, nearly twice the response seen towards soluble Fn, when directly comparing soluble concentrations during chemotaxis to soluble concentrations during membrane coating prior to haptotaxis. In contrast, haptotaxis of human cells toward Fn was weaker than chemotaxis. For Coll, human cells did not respond in a stronger manner than rabbit as was the case for chemotaxis. Haptokinesis controls were also performed by coating both sides of the membrane with the optimal concentration eliciting haptotaxis (Table 2). In this case, the presence of ECM proteins activated cell migration, with random migration of haptokinesis controls accounting for about 50% of the haptotaxis response. Nonetheless, in all cases, the haptotactic response was significantly higher than the haptokinesis control, indicating cells are not only activated to move by ECM proteins, but directed movement is further promoted by a gradient in concentration of bound sites.

Given that haptokinesis controls demonstrated that significant random migration was elicited by contact with ECM proteins, we also tested the influence of several

membrane coatings on the cell migration response to PDGF-BB (Table 3). BSA was used as a protein control, while hyaluronan was also examined based on a recent report of a PDGF-BB-induced increase in HA receptor (CD44) expression on mouse MSC, facilitating MSC migration on hyaluronan (59). Since we wanted to be able to detect synergistic or potentiation effects, we tested substrate-coated membranes with sub-optimal PDGF-BB concentration i.e. 1 ng/ml. Results indicated that the increase in random migration by ECM proteins Fn, Vn, collagen and gelatin significantly decreased the chemotactic response to PDGF-BB compared to PDGF-BB alone (Table 3 compared to Fig. 2A). In contrast, coating membranes with hyaluronic acid and BSA entirely blocked chemotaxis of MSC from both species, whether in the absence or presence of PDGF-BB.

Discussion

The primary objective of this study was to assess the chemotactic and haptotactic properties towards MSCs of extracellular matrix components present during wound repair and to compare human MSCs to rabbit, a common animal model in orthopaedic tissue repair. In the course of attaining this objective we also addressed the optimization of the transmembrane chemotaxis assay (TCA) resulting in a dramatic increase in the sensitivity and reproducibility of this assay. We then used this standardized assay 1) to test rabbit cells and shed light on conflicting results with human MSC in the literature towards TGF β 1, PDGF-BB and FGF-2, 2) to demonstrate a novel motogenic activity of

Fn, Vn and Coll on MSC and finally 3) to demonstrate an overall similar motogenic behavior between rabbit and human cells.

Transmembrane Chemotactic Assay Optimized by Removal of BSA and Pre-migration Cell Attachment Time and Use of Cell Starvation and Glutaraldehyde Fixation

BSA is an important component of serum and can act as a carrier protein and protect cells against mechanical shock and toxicity. Yet BSA is not always used in published migration assays as BSA supplemented buffers (from 0.1 to 1%) are sometimes employed (47) and sometimes not (18) without any particular stated rationale. Our results indicate that BSA inhibits chemotaxis of MSC in the TCA, whether it is used in the cell buffer or in the chemoattractant buffer. We also found that pre-migration attachment time, employed in some studies with mesenchymal cell types (57, 58) significantly reduced cell migration. This may not be surprising since it is well established that optimal migration depends on a fine balance between attachment and detachment from the substrate (25). Although the specific processes responsible for inhibiting cell migration due to BSA and pre-migration attachment time were not further investigated here, it seems likely that both act through modification of cell adhesion where BSA abrogates adhesion to an insufficient level to support migration whereas extended pre-migration attachment time creates an overly adherent state that is non-conducive to motile behavior. Our results with BSA are in accordance with others using highly motile melanoma cells (53), showing complete inhibition of migration with BSA

coated membranes and where BSA coating of culture vessels totally prevents colony formation of MSC (34). Taken together, these results raise concerns about the widespread use of BSA supplemented buffers in cell migration studies. Our observations of reduced migration after longer periods of pre-migration culture time are also consistent with previous observations where trypsinised fibroblastic cells needed no more than 1hr to form actin-based adhesions (60), and that such complexes, indicative of sessile cellular phenotype (61), are formed with MSC cultured on polycarbonate membranes (50). Such complexes could explain the relatively long migration time (up to 24 hrs) needed in these studies (57, 58).

Although the migration induced by PDGF-BB is generally consistent with other studies (18, 47), our optimized procedure resulted in increased migration of MSC towards PDGF-BB by more than 5 times compared to a previous study that obtained 3% migrated cells at 10 ng/ml (47) and more than 9 times a previous study that obtained a maximum CI of 6.5 with 1 ng/ml PDGF-BB (18). To our knowledge, the level of migration of MSCs towards PDGF-BB we obtained with the optimized procedure (~20% migrated cells with a CI of ~50) have not been found previously in any study, including those employing other mesenchymal cell types (48, 62). In absolute terms, only (47) with 17% migration of MSC moving towards plasma on fibronectin-coated membranes approached this level of migration, however most of this migration, nearly 15%, was accounted for by chemokinesis, or random migration. Due to the general lack of detailed methodology in many previous studies, it is

difficult to pinpoint the specific reasons for these discrepancies, however the use of BSA (47) and paraformaldehyde fixation (18) are potential factors. These results are in contrast to another report showing no activity at all of PDGF-BB on mouse MSCs (59), possibly due to a species-dependence.

We found that FGF-2 and TGF- β 1 have no motogenic activity on rabbit and human MSC coinciding with previous work on human cells (16), suggesting uncommitted MSC do not migrate toward TGF- β 1 and FGF-2, and that only committed osteogenic cells respond to TGF- β 1, also in agreement with other studies (63, 64). Although FGF-2 is recognized as chemoattractive to osteoblasts and various other wound healing cells, mixed and usually species dependent results have been obtained with MSC being chemotactic at widely varying levels for mouse, rat and chick progenitor cells (17, 43, 65). Thus the functional motility characteristics we found for cells in our study agree with the FACS profiling of the human cells indicating that these BMSC display an uncommitted phenotype, as is the case for marrow-derived MSCs from human and rabbit in the absence of exogenous osteogenic factors (51, 66). Furthermore, our results suggest that at least rabbit and human cells have a similar motogenic behavior, and do not display the inter-species cytokine-induced motogenic variability that has been seen when comparing mice, rat and human MSCs for TGF- β (16, 43, 44, 65), an inconsistency that has also been reflected with other non-osteogenic fibroblastic cells (48).

Fibronectin, Vitronectin and Collagen I are Chemotactic and Haptotactic for

MSCs

Cell-ECM interactions are widely recognized to play significant roles in tissue development and repair, via integrin binding and intracellular signaling that regulates many aspects of cell function including adhesion, differentiation, proliferation, migration and apoptosis (24). In this study, we have demonstrated that Fibronectin, Vitronectin and Collagen I have the capacity to induce directed migration of rabbit and human MSC by both chemotaxis and haptotaxis, in the absence of soluble cytokines.

Circulating progenitors are believed to be in low concentration (8), although a recent report suggests higher concentrations than initially thought can be present (67). Moreover, emerging evidence suggests the ontogeny of the quintessential wound fibroblasts may originate from bone marrow MSC, and not from local recruitment and proliferation as initially proposed (9), opening new questions on environmental cues and mechanisms involved in the recruitment of MSC in tissue repair sites non-contiguous to the marrow. Our result suggests soluble ECM proteins could play a role in MSC recruitment by inducing directional migration toward sites of injury or regeneration in a similar fashion as cytokines (18, 19). This is in accordance with the fact that in the wound, the concentration of these proteins can rise several fold derived from several sources including plasma exudates, platelet degranulation, synthesis by local cells such as macrophages and fibroblast, and by proteolysis from the provisional matrix or surrounding tissue (68-70). The ability of these ECM components to chemoattract MSCs

would also agree with their accepted recruitment of other cell types involved in the wound, from neutrophils and macrophages (30, 71-73), to fibroblasts and epithelial cells (31, 49, 74). Combined with in vivo studies, these in vitro results could also shed light on the temporal sequence in which MSC appear in wounds, which is not completely understood, but which proposes that MSCs arrive at stages following inflammation and leukocyte wound-clearing (3, 9, 11, 75).

The ability of substrate-bound ECM proteins to sustain directed movement was also demonstrated in our study, with results on Fn, Vn and Coll similar to haptotaxis obtained with mouse embryonic fibroblast (76) or rabbit chondrocytes with Fn and Coll (77). Haptotaxis to a specific protein is closely associated with the corresponding specific integrins (14), and in this respect, the smaller response initiated by Vn is in line with the relative smaller expression of its receptor compared to Coll or Fn on MSC (36). The motogenic response elicited by the insoluble form of these proteins is a new complement to other documented responses initiated by Fn, Vn and Coll on MSC, such as promotion of cell adhesion and spreading (34, 35), and, for Coll and Vn, osteogenic induction independent of soluble agents such as TGF β or dexamethasone/B glycerolphosphate (35, 36).

Insoluble ECM proteins also initiated random migration, as seen with membranes coated on both sides, which accounted for about 50% of all haptotaxis responses. An increase in random migration on ECM-coated membrane has been demonstrated elsewhere with fibroblasts (48) and also MSCs (47). Many chemotaxis studies with

soluble cytokines coat membranes with ECM proteins, a practice that our results suggest may not be beneficial for MSC chemotaxis, since the chemotactic index to PDGF-BB was reduced due to increased migration from the coating itself. However, the locomotive activation elicited by these ECM proteins nonetheless reflects a primary function of wound matrices: to provide a scaffold that promotes cell recruitment and movement (14). Because MSCs (78) are known to synthesize and deposit Fn and collagen in vitro, it is plausible that through *de novo* synthesis and deposition of these ECM proteins, these cells remodel the matrix wound to favor MSC migration, a process suggested for other cell types (79, 80). Collectively, this novel finding of ECM-induced MSC directed migration, considering the number of new studies dedicated to the discovery of motogenic factors for MSC, constitutes a pertinent contribution to the understanding of MSC motile behavior and on the multifunctionality of these ECM components. These results may lead to the implementation of these novel strategies in regenerative medicine.

The use of ECM-derived peptides for creating cell instructive scaffolds has already proved beneficial in bone defects when used alone (81), or in combination with cytokine delivery (82), however patterned motifs in the form of insoluble gradients have yet to be tested in an orthopedic context. Recent technical advances in surface micropatterning has made possible the generation of tightly controlled gradients of various ECM molecules, which have been used to direct neuronal growth (28, 83) and angiogenesis (84), suggesting haptotaxis using these proteins could serve as a tool to

control the distribution of transplanted MSC in scaffold-based strategies. MSC-seeded scaffolds could be engineered to induce the release of transplanted MSC into the wound, a limitation in many cell-based strategies (85). Alternatively, outside-in gradients could be used to improve scaffold-tissue integration, another common limitation in tissue engineering (86), by promoting surrounding cell and tissue infiltration by haptotaxis. Moreover, cell recruitment strategies with drug delivery systems could employ soluble ECM-proteins, rather than cytokines.

The dual action of ECM proteins to induce chemotactic and haptotactic cell migration has been demonstrated with other cell types where many investigators propose different sets of receptors and/or separate structural domains of the proteins (53, 77, 79) for each type of migration. Here, as opposed to cancer cells, where the impetus to find migration blocking agents as prompted this kind of research, (52-54, 79) we have not investigated the underlying mechanisms and receptors responsible for the observed motility, which can be viewed as a limitation of this study. Instead, we have identified new factors, optimal doses, and assay refinements that provide insights on the density and distribution of ECM proteins for biofunctional scaffolds that could harness the potential MSCs for tissue regeneration and other therapeutic applications.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Canadian Arthritis Network of Centres of Excellence (CAN-NCE).

References

1. Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
2. Jiang Y, BN Jahagirdar, RL Reinhardt, RE Schwartz, CD Keene, XR Ortiz-Gonzalez, M Reyes, T Lenvik, T Lund, M Blackstad, J Du, S Aldrich, A Lisberg, WC Low, DA Largaespada and CM Verfaillie. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
3. Shapiro F, S Koide and MJ Glimcher. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553.
4. Pountos I and PV Giannoudis. (2005). Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36 Suppl 3:S8-S12.
5. Caplan AI. (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198-1211.
6. Fukuda K. (2005). Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J* 69:1431-1446.
7. Tropel P, N Platet, JC Platel, D Noel, M Albrieux, AL Benabid and F Berger. (2006). Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem

cells. Stem Cells.

8. Kuznetsov SA, MH Mankani, S Gronthos, K Satomura, P Bianco and PG Robey. (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153:1133-1140.
9. Opalenik SR and JM Davidson. (2005). Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *Faseb J* 19:1561-1563.
10. Sellers RS, D Peluso and EA Morris. (1997). The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79:1452-1463.
11. Zantop T, TW Gilbert, MC Yoder and SF Badylak. (2006). Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. *J Orthop Res* 24:1299-1309.
12. Wakitani S, T Goto, SJ Pineda, RG Young, JM Mansour, AI Caplan and VM Goldberg. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-592.
13. Von Luttichau I, M Notohamiprodjo, A Wechselberger, C Peters, A Henger, C Seliger, R Djafarzadeh, R Huss and PJ Nelson. (2005). Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev* 14:329-336.

14. McCarthy JB, Iida, J., Furcht, LT. (1996). Mechanisms of Parenchymal Cell Migration Into Wounds. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. RA Clark, ed. Plenum Press, New York, pp 373-386.
15. Firtel RA and CY Chung. (2000). The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays* 22:603-615.
16. Fiedler J, G Roderer, KP Gunther and RE Brenner. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:305-312.
17. Annabi B, S Thibeault, YT Lee, N Bousquet-Gagnon, N Eliopoulos, S Barrette, J Galipeau and R Beliveau. (2003). Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 31:640-649.
18. Fiedler J, N Etzel and RE Brenner. (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem* 93:990-998.
19. Fiedler J, F Leucht, J Waltenberger, C Dehio and RE Brenner. (2005). VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334:561-568.
20. Fiedler J, C Brill, WF Blum and RE Brenner. (2006). IGF-I and IGF-II stimulate

directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells.

Biochem Biophys Res Commun 345:1177-1183.

21. Maes C, L Coenegrachts, I Stockmans, E Daci, A Luttun, A Petryk, R Gopalakrishnan, K Moermans, N Smets, CM Verfaillie, P Carmeliet, R Bouillon and G Carmeliet. (2006). Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest* 116:1230-1242.
22. Honczarenko M, Y Le, M Swierkowski, I Ghiran, AM Glodek and LE Silberstein. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24:1030-1041.
23. Boudreau NJ and PL Jones. (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 (Pt 3):481-488.
24. Schwartz MA and MH Ginsberg. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4:E65-68.
25. Lauffenburger DA and AF Horwitz. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
26. Geho DH, RW Bandle, T Clair and LA Liotta. (2005). Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)* 20:194-200.

27. Li S, JL Guan and S Chien. (2005). Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng* 7:105-150.
28. Yu TT and MS Shoichet. (2005). Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials* 26:1507-1514.
29. Yamada KM, Clark, R.A. (1996). Provisional Matrix. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. RA Clark, ed. Plenum Press, New York, pp 51-82.
30. Postlethwaite AE and AH Kang. (1976). Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J Exp Med* 143:1299-1307.
31. Postlethwaite AE, JM Seyer and AH Kang. (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:871-875.
32. Grinnell F. (1984). Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 26:107-116.
33. Preissner KT and D Seiffert. (1998). Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb Res* 89:1-21.
34. Gronthos S, PJ Simmons, SE Graves and PG Robey. (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181.
35. Salaszyk RM, WA Williams, A Boskey, A Batorsky and GE Plopper. (2004).

Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004:24-34.

36. Kundu AK and AJ Putnam. (2006). Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347:347-357.

37. Chastain SR, AK Kundu, S Dhar, JW Calvert and AJ Putnam. (2006). Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A* 78:73-85.

38. Rudert M. (2002). Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs* 171:229-240.

39. Huang Q, JC Goh, DW Hutmacher and EH Lee. (2002). In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng* 8:469-482.

40. Hoemann CD, M Hurtig, E Rossomacha, J Sun, A Chevrier, MS Shive and MD Buschmann. (2005). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87:2671-2686.

41. Han SK, TH Yoon, DG Lee, MA Lee and WK Kim. (2005). Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro. *Ann Plast Surg* 55:414-

419.

42. Diefenderfer DL, AM Osyczka, JP Garino and PS Leboy. (2003). Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:19-28.

43. Andrades JA, B Han, J Becerra, N Sorgente, FL Hall and ME Nimni. (1999). A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 250:485-498.

44. Makhijani NS, DS Bischoff and DT Yamaguchi. (2005). Regulation of proliferation and migration in retinoic acid treated C3H10T1/2 cells by TGF-beta isoforms. *J Cell Physiol* 202:304-313.

45. Werner S and R Grose. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835-870.

46. Hofer EL, V La Russa, AE Honegger, EO Bullorsky, RH Bordenave and NA Chasseing. (2005). Alteration on the expression of IL-1, PDGF, TGF-beta, EGF, and FGF receptors and c-Fos and c-Myc proteins in bone marrow mesenchymal stroma cells from advanced untreated lung and breast cancer patients. *Stem Cells Dev* 14:587-594.

47. Ruster B, B Grace, O Seitz, E Seifried and R Henschler. (2005). Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell

assay. *Stem Cells Dev* 14:231-235.

48. Schor SL, IR Ellis, K Harada, K Motegi, AR Anderson, MA Chaplain, RP Keatch and AM Schor. (2006). A novel 'sandwich' assay for quantifying chemo-regulated cell migration within 3-dimensional matrices: wound healing cytokines exhibit distinct motogenic activities compared to the transmembrane assay. *Cell Motil Cytoskeleton* 63:287-300.
49. Chen HC. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 294:15-22.
50. Thibault MM and MD Buschmann. (2006). Migration of bone marrow stromal cells in 3D: 4 Color methodology reveals spatially and temporally coordinated events. *Cell Motil Cytoskeleton*, Epub ahead of print.
51. Owen ME, J Cave and CJ Joyner. (1987). Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J Cell Sci* 87 (Pt 5):731-738.
52. Sieg DJ, CR Hauck and DD Schlaepfer. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112 (Pt 16):2677-2691.
53. Taraboletti G, DD Roberts and LA Liotta. (1987). Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol* 105:2409-2415.
54. Klemke RL, S Cai, AL Giannini, PJ Gallagher, P de Lanerolle and DA Cheresh.

- (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137:481-492.
55. Sieg DJ, D Ilic, KC Jones, CH Damsky, T Hunter and DD Schlaepfer. (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *Embo J* 17:5933-5947.
56. Scragg MA and LR Ferreira. (1991). Evaluation of different staining procedures for the quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates. *Anal Biochem* 198:80-85.
57. Chang C, DA Lauffenburger and TI Morales. (2003). Motile chondrocytes from newborn calf: migration properties and synthesis of collagen II. *Osteoarthritis Cartilage* 11:603-612.
58. Karp JM, TS Tanaka, R Zohar, J Sodek, MS Shoichet, JE Davies and WL Stanford. (2005). Thrombin mediated migration of osteogenic cells. *Bone* 37:337-348.
59. Zhu H, N Mitsuhashi, A Klein, LW Barsky, K Weinberg, ML Barr, A Demetriou and GD Wu. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 24:928-935.
60. Dourdin N, AK Bhatt, P Dutt, PA Greer, JS Arthur, JS Elce and A Huttenlocher. (2001). Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 276:48382-48388.

61. Ridley AJ, MA Schwartz, K Burridge, RA Firtel, MH Ginsberg, G Borisy, JT Parsons and AR Horwitz. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
62. Siegbahn A, A Hammacher, B Westermark and CH Heldin. (1990). Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 85:916-920.
63. Lucas PA. (1989). Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta. *Bone* 10:459-463.
64. Pfeilschifter J, O Wolf, A Naumann, HW Minne, GR Mundy and R Ziegler. (1990). Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 5:825-830.
65. Lucas PA and AI Caplan. (1988). Chemotactic response of embryonic limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblasts to transforming growth factor-beta. *Connect Tissue Res* 18:1-7.
66. Haynesworth SE, J Goshima, VM Goldberg and AI Caplan. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88.
67. Khosla S and GZ Eghbali-Fatourehchi. (2006). Circulating cells with osteogenic potential. *Ann N Y Acad Sci* 1068:489-497.

68. Grinnell F, RE Billingham and L Burgess. (1981). Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol* 76:181-189.
69. Steffensen B, L Hakkinen and H Larjava. (2001). Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 12:373-398.
70. Clark RA. (1996). Wound Repair: Overview and General Considerations. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* Plenum Press, New York, pp 3-35.
71. Clark RA. (1988). Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol* 124:201-206.
72. Hendey B, CB Klee and FR Maxfield. (1992). Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* 258:296-299.
73. Everitt EA, AB Malik and B Hendey. (1996). Fibronectin enhances the migration rate of human neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol* 60:199-206.
74. Mensing H, BF Pontz, PK Muller and V Gauss-Muller. (1983). A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur J Cell Biol* 29:268-273.
75. Chevrier A, CD Hoemann, J Sun and MD Buschmann. (2006). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and

subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*.

76. Pradip D, X Peng and DL Durden. (2003). Rac2 specificity in macrophage integrin signaling: potential role for Syk kinase. *J Biol Chem* 278:41661-41669.
77. Shimizu M, K Minakuchi, S Kaji and J Koga. (1997). Chondrocyte migration to fibronectin, type I collagen, and type II collagen. *Cell Struct Funct* 22:309-315.
78. Eaves AC and CJ Eaves. (1988). Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells. *Blood Cells* 14:355-368.
79. Klominek J, KH Robert and KG Sundqvist. (1993). Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res* 53:4376-4382.
80. Wilcox SA, T Reho, PJ Higgins, E Tominna-Sebald and PJ McKeown-Longo. (1996). Localization of urokinase to focal adhesions by human fibrosarcoma cells synthesizing recombinant vitronectin. *Biochem Cell Biol* 74:899-910.
81. Lutolf MP, FE Weber, HG Schmoekel, JC Schense, T Kohler, R Muller and JA Hubbell. (2003). Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 21:513-518.
82. Simmons CA, E Alsberg, S Hsiong, WJ Kim and DJ Mooney. (2004). Dual

growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35:562-569.

83. Dertinger SK, X Jiang, Z Li, VN Murthy and GM Whitesides. (2002). Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12542-12547.

84. Dike LE, CS Chen, M Mrksich, J Tien, GM Whitesides and DE Ingber. (1999). Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:441-448.

85. Silva EA and DJ Mooney. (2004). Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 64:181-205.

86. Hollister SJ. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4:518-524.

Tables

Table 7.1: The effect of fixation method on counted cells was assessed after chemotaxis to 10 ng/ml PDGF-BB. Results are expressed as Mean \pm SD (N= 3) and % decrease in migrated cells for each procedure is compared to the optimized procedure using glutaraldehyde. * denotes $p < 0.05$ compared to glutaraldehyde fixation.

Table 7.2: Random migration in haptotaxis experiments was evaluated with haptokinesis controls, where membranes were precoated on both sides with ECM proteins as described in Materials and Methods using the concentrations eliciting optimal haptotaxis (Fig. 4), of 20 $\mu\text{g/ml}$ Fn, 10 $\mu\text{g/ml}$ Vn and 25 $\mu\text{g/ml}$ Coll. The haptotaxis ratio was calculated as the ratio of migrated cells with precoating on the bottom surface only to migrated cells with both top and bottom surfaces coated. Result are expressed as Mean \pm SD (N = 4) where * denotes $p < 0.05$ between haptotaxis and the respective haptokinesis control.

Table 7.3: Membranes were precoated with substrates on both sides as described in Materials and Methods to test the interaction effect with chemotaxis induced by PDGF-BB at 1 ng/ml. Concentrations of coating agents were 20 $\mu\text{g/ml}$ Fn, 10 $\mu\text{g/ml}$ Vn, 25 $\mu\text{g/ml}$ Coll, 50 $\mu\text{g/ml}$ gelatin, 5 mg/ml HA and 1 mg/ml BSA. Results in the first two left most columns show the percentage of migrated rabbit MSCs in the absence and presence of PDGF-BB in the lower well. The Chemotactic Index (CI) was calculated by dividing the percentage of migrated cells with PDGF and substrate coating by the value

of respective control with substrate coating only. The percentage of optimal response was calculated using the CI obtained here versus the CI elicited by PDGF-BB at 1ng/ml with rabbit cells without coating (Fig 2) of CI= 49.74. Result are expressed as Mean \pm SD (N = 4, except for PDGF-BB and coating which were with N = 2).

Tables

Table 7.1. Effect of Cell Fixation on Counted Cells after PDGF-induced Migration of Rabbit MSC

<i>Cell Fixation</i>	<i>% Migrated Cells</i>	<i>% Decrease</i>
	19.83 ± 0.96	-
1% Glutaraldehyde PBS		
70 % Ethanol	17.94 ± 1.64	0.8%
Absolute Icecold Methanol	7.54 ± 1.00 *	38%*
4% Paraformaldehyde in PBS	7.72 ± 0.90 *	38%*

* p < 0.05 compared to glutaraldehyde fixation.

Table 7.2. Evaluation of the haptokinesis response

Precoating	<i>Species</i>	<i>Haptotaxis, % migrated cells</i>	<i>Haptokinesis, % migrated cells</i>	<i>Haptotactic ratio</i>
Fibronectin	Rabbit	25.3 ± 2.4*	14.6 ± 3.2	1.7*
	Human	5.6 ± 0.3*	3.3 ± 0.7	1.7*
Vitronectin	Rabbit	6.0 ± 0.5*	4.1 ± 0.6	1.5*
	Human	2.4 ± 0.4*	1.0 ± 0.1	2.3*
Collagen 1	Rabbit	8.9 ± 1.7*	4.6 ± 1.0	1.9*
	Human	6.0 ± 1.0*	2.3 ± 0.3	2.6*

Mean ± SD (N = 4). * p < 0.05, haptotaxis versus respective haptokinesis control.

Table 7.3. PDGF-BB-induced Chemotaxis on Different Substrates

<i>Precoating</i>	<i>Substrate-Only, % migrated cells N=4</i>	<i>With PDGF, % migrated cells N=2</i>	<i>CI</i>	<i>% of CI in absence of coating</i>
Fibronectin	14.6 ± 3.0	21.9 ± 3.0	1.5	3.0
Vitronectin	4.1 ± 0.6	14.1 ± 0.3	3.4	6.9
Collagen 1	4.6 ± 1.0	8.9 ± 2.0	1.9	3.8
Gelatin	1.1 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.2	6.5
Hyaluronan	0	0	0	-
BSA	0	0	0	-

Figures and Figure Captions

Figure 7.1: The presence of time for cell attachment to the membrane prior to establishing the chemoattractant gradient reduced cell migration (A) as did the presence of soluble BSA (B). (A) Rabbit MSC were incubated for 0, 60 or 120 minutes on the upper surface of the membranes before establishing a gradient with 10 ng/ml PDGF-BB (B) With no pre-attachment of the cells, BSA was added at 0.1% w/v or 1% w/v concentrations in either cell buffer in the upper chamber or the chemoattractant buffer in the lower chamber or in both to test the effect of BSA on the migration of rabbit cells compared to a positive control of PDGF-BB (10 ng/ml) without BSA. Percent migrated cells, expressed as Mean \pm SD (N=4), were significantly ($p < 0.05$) reduced when pre-migration attachment time was increased or when soluble BSA was present.

Figure 7.2: Specific and dose-dependent chemotaxis of rabbit and human MSCs toward PDGF-BB (A) occurred, but not towards TGF β 1 (B) nor FGF-2 (C). Directed cell migration was carried out in the transmembrane assay using the optimized procedure detailed in the Materials and Methods. Results are expressed for both species as percentage of total cells that migrated (left y-axis) or as the chemotactic index that is the ratio of migrated cells for a particular chemoattractant to the control without chemoattractant (right y-axis). Negative controls without chemoattractant (0 μ g/ml) and chemokinesis controls using PDGF-BB in both the upper and lower chamber did not elicit migration (not shown). Results are presented as the Mean \pm SD. (A) All concentrations of PDGF-BB above 0.1 μ g/ml induced more cell migration ($p < 0.05$, N=

8) than the negative control. (B,C) TGF β 1 and FGF-2 did not elicit any migration from any species at those concentrations tested (N= 4).

Figure 7.3: Dose-dependent chemotaxis of rabbit and human MSCs toward soluble RGD-containing extracellular matrix proteins Fn (A), Vn (B) and Col1 (C). Directed cell migration was carried out in the transmembrane assay using the optimized procedure detailed in the Materials and Methods. Results are given as the Mean \pm SD (N= 4) of percentage of total cells that migrated for both species. Negative controls (0 μ g/ml) did not elicit migration. Chemokinesis controls (ck) were performed using substrata coated with protein at optimal concentrations, including Fn (20 μ g/ml), Vn (10 μ g/ml) and Col1 (25 μ g/ml) in both upper and lower chambers and were found to be < 0.1% migrated cells. All concentrations of Fn, Vn, Col1 above 0.1 μ g/ml induced cell migration that was higher ($p < 0.05$, N=4) than negative controls.

Figure 7.4: Dose-response for haptotaxis of rabbit and human MSCs toward insoluble surface-bound ECM components Fn (A), Vn (B) and Col1 (C). The bottom surfaces of membranes were coated with a step gradient of increasing concentrations of ECM proteins as described in Materials and Methods. Results (Mean \pm SD, N= 4) are expressed as percentage of total cells that migrated. All concentrations above 1 μ g/ml for each ECM elicited cell migration that was significantly ($p < 0.05$) higher than the negative control.

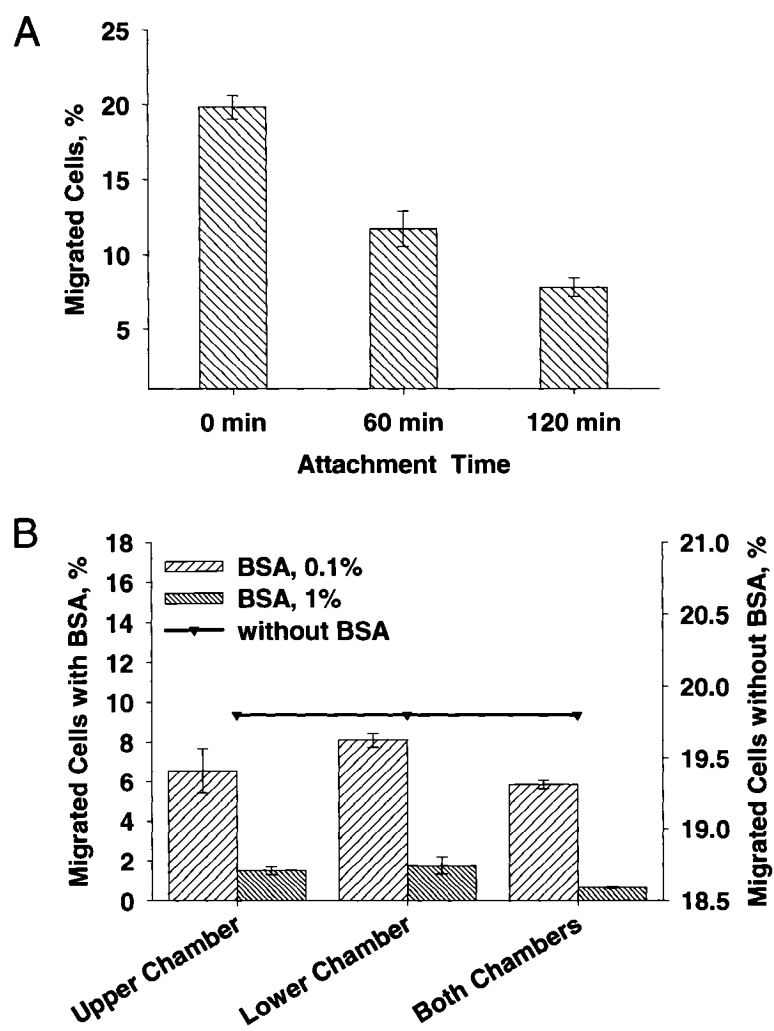


Figure 7.1

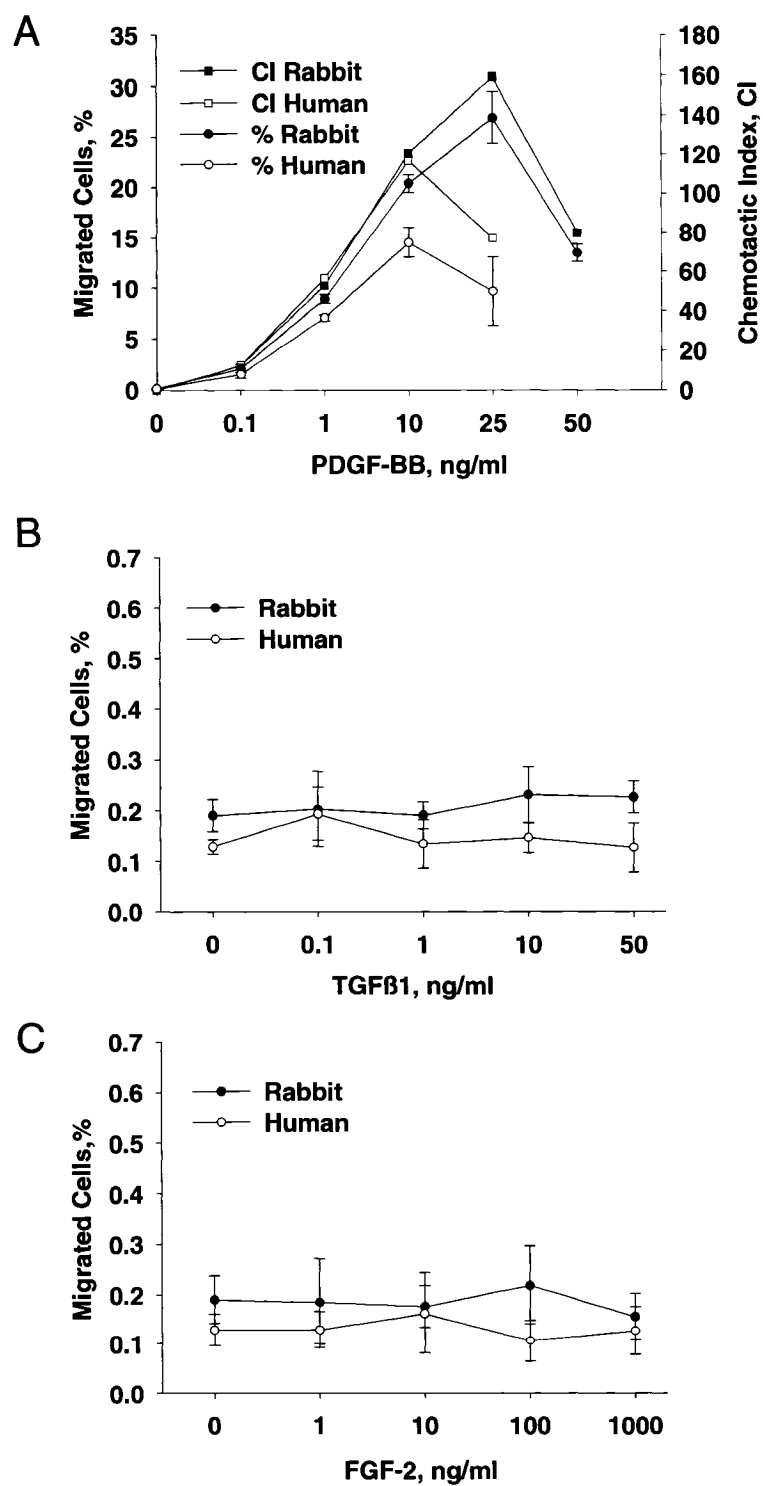


Figure 7.2

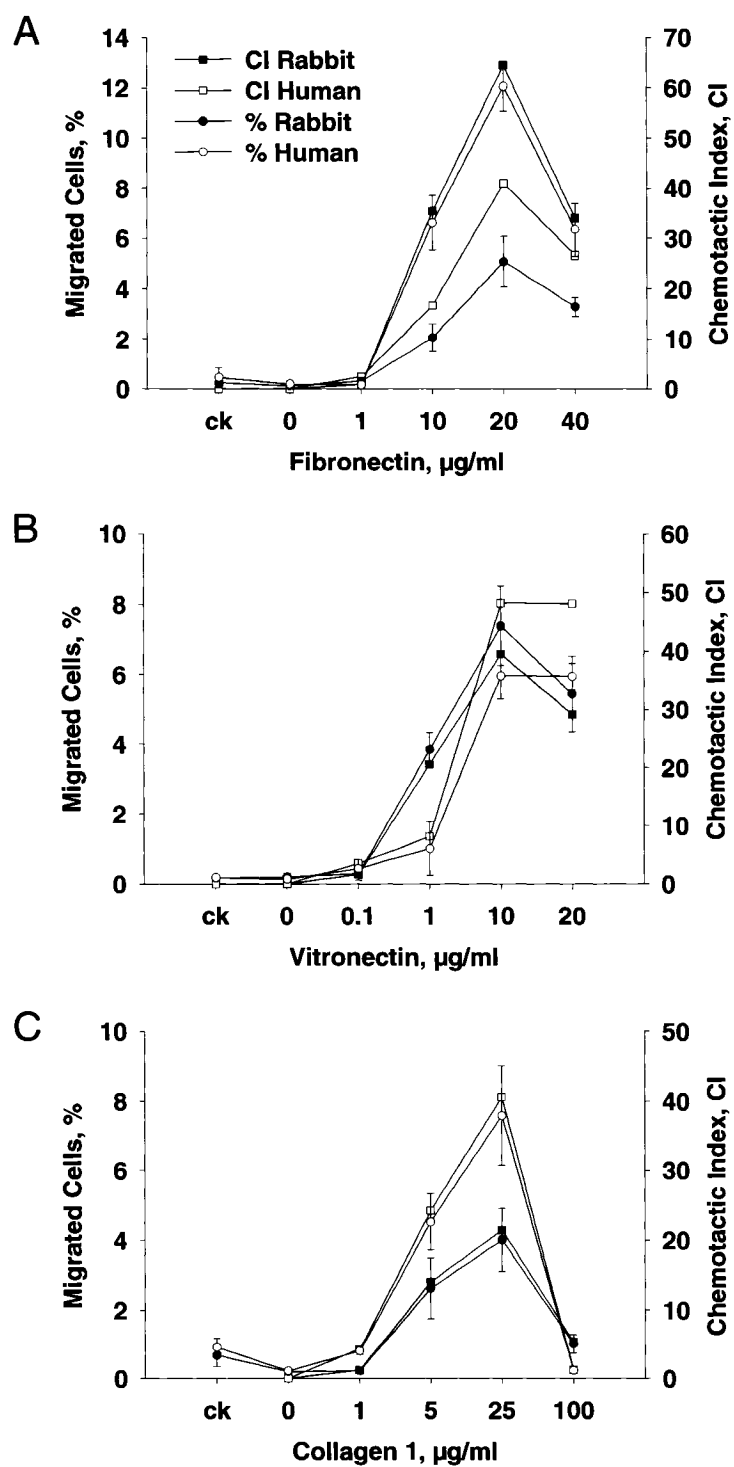


Figure 7.3

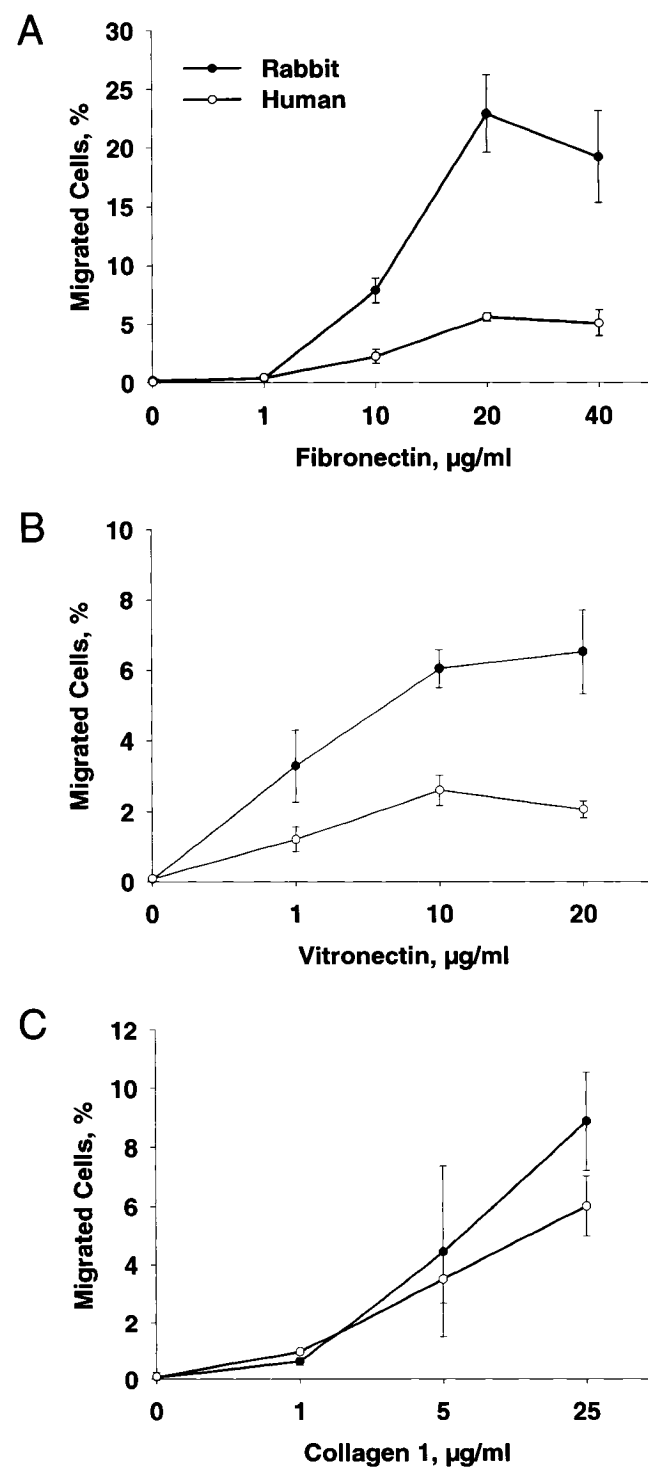


Figure 7.4

SYNTHÈSE GÉNÉRALE, DISCUSSION et CONCLUSION

Le cartilage articulaire est un tissu qui n'arrive pas à se réparer complètement à la suite d'une lésion. Des millions de personnes subissent les conséquences d'une lésion du cartilage, douleurs et finalement perte de mouvement. Malgré des efforts considérables de la communauté scientifique, il n'y a toujours pas de traitement idéal. Les remplacements de hanches ou autres arthroplasties procurent un soulagement certain, mais ils sont très coûteux, invasifs et temporaires. Leur durée de vie de 10-15 ans les rend peu recommandables pour les jeunes patients. On se tourne donc souvent vers les techniques de stimulation de la moelle, moins invasives que l'arthroplastie. Par contre, s'il est supérieur aux défauts non traités, le tissu cicatriciel obtenu n'est pas biomécaniquement stable et il se détruit avec le temps. La recherche s'intéresse maintenant de plus en plus aux techniques complexes de transplantation et de génie tissulaire dans l'espoir d'obtenir une régénération du cartilage. Le développement de ces techniques nécessite une compréhension des mécanismes de la dégradation et de la régénération du tissu.

Notre première étude avait pour objectif de déterminer si des forces mécaniques élevées mais physiologiques étaient capables d'induire une perturbation du réseau de collagène des explants cartilagineux. Nous avons observé que les compressions cycliques non confinées avaient la capacité d'induire une panoplie de changements au niveau de la matrice. Dans un premier temps, les effets induits mécaniquement

immédiats sont une réduction des propriétés mécaniques et une dénaturation du collagène de type II. La dénaturation de la molécule produit une altération de l'intégrité de la matrice qui se manifeste par une diminution du module en tension de collagène ainsi que par une augmentation de la perméabilité hydraulique. Ces effets sur la structure de la matrice ne s'accompagnaient pas de signes de compressions exagérées et non physiologiques, comme une perte de viabilité cellulaire, une fissuration du tissu ou une fracture de l'os sous-jacent (Jeffrey, Gregory et al. 1995).

Plusieurs facteurs abordés par notre étude tendent à démontrer que ces effets sont uniquement dus aux contraintes mécaniques et non à une activation indirecte des enzymes, incluant l'absence de néo-épitopes spécifiques au site de clivage des collagénases et l'incapacité des inhibiteurs de ces enzymes à bloquer la dégradation. Le temps relativement court qui s'écoule entre les compressions et le moment où les explants sont congelés post-chargement est aussi révélateur d'une absence d'activité enzymatique, au même titre que l'est l'absence de fragments de matrice dans le milieu immédiatement après les compressions. Par contre, lorsque les explants sont gardés en culture post-chargement, des fragments de la matrice peuvent être décelés dans le milieu. Parallèlement, les explants cultivés perdent les molécules dégradées détectées après le chargement, laissant croire à une altération de l'équilibre et à l'induction d'événements biochimiques qui provoquent la perte des molécules endommagées. De manière générale, les résultats suggèrent que les chargements mécaniques jouent un rôle intrinsèque dans le contrôle homéostatique du métabolisme du collagène, lequel s'avère

important pour l'état physiologique et pathologique du cartilage.

Bien sûr, les études *in vitro* comportent des limitations quand vient le temps d'extrapoler vers des systèmes physiologiques. Même si l'interface os/cartilages est présente dans notre système et si les forces ne sont pas excessives, les conditions frontières du système pourraient apporter des différences marquées avec les compressions *in vivo*. Par exemple, l'expansion latérale d'explant soumis à des compressions non confinées pourrait être supérieure et engendrer des tensions non physiologiques. L'augmentation importante du collagène dénaturé qui résulte des chargements permet toutefois de consolider les conclusions et d'émettre de nouvelles hypothèses.

L'absence de composantes enzymatiques permet de supposer que la déformation du cartilage articulaire induite par le mouvement ou toute autre activité physique se traduit en partie par le déroulement de certaines molécules de collagène. L'activité physique pourrait être un paramètre important du métabolisme du cartilage, particulièrement en ce qui est du renouvellement ou du réarrangement du réseau de collagène. La nature transitoire du collagène dégradé dans les explants conforte cette hypothèse. La dénaturation mécanique du collagène se trouverait à augmenter la susceptibilité moléculaire du collagène aux enzymes normalement incapables de cliver la triple hélice, ce qui laisse croire que des enzymes moins spécifiques que les collagénases pourraient être responsables de l'entretien et de la perte du tissu en condition homéostatique. Au niveau pathologique, un débalancement de la régulation de toutes les

enzymes - pas seulement des collagénases - capables de cliver la molécule native ou déroulée crée donc des problèmes et pourrait même causer cette dégradation progressive de la matrice qui conduit à l'ostéoarthrite. Dans le milieu scientifique actuel, où une grande partie des ressources humaines et financières affectées au problème de l'arthrose est mobilisée par la mise au point de thérapies pharmacologiques capables de bloquer l'activité enzymatique, nos résultats laissent entendre que des approches qui cibleraient le site des lésions dans un contexte de régénération pourraient être plus prometteuses.

La compréhension de l'intime relation entre structure et fonction biomécanique des tissus musculosquelettiques est un défi scientifique qui occupe encore nombre de chercheurs, motivés entre autres par la quantité des pathologies et la nature douloureuse et débiliteuse de celles-ci. Notre étude fournit les fondements nécessaires à une nouvelle avenue de recherche sur les rôles des processus mécaniques et enzymatiques induits par le chargement du cartilage sur son métabolisme. Étant donné que la perte de protéoglycanes et la dénaturation du collagène sont des signes de dégradation du cartilage et de l'ostéoarthrite, cette approche peut aussi servir de modèle *in vitro* à l'étude de ces processus.

Nous avons vu ci-dessus que la nature purement mécanique des effets dommageables subis par la matrice explique que notre étude ne peut pas déboucher sur une approche pharmacologique. Notre recherche recommande au contraire une méthode ciblée de régénération qui pourrait mieux servir les personnes souffrant d'une dégradation du cartilage. Quand il s'agit d'ostéoarthrite, cette approche fait d'ailleurs

maintenant l'unanimité (Caplan 2005). C'est dans cette perspective que s'inscrivent les deux études suivantes. Dans notre deuxième article, nous avons observé la dynamique et l'organisation des éléments du cytosquelette et du noyau d'une cellule en migration dans un environnement 3D. La technique consiste à marquer chacun des éléments d'une même cellule tout en veillant à préserver leur intégrité. L'avantage de cette technique tient au fait qu'elle permet d'observer simultanément les détails structuraux des éléments marqués dans une cellule, donc leurs interactions spatio-temporelles, dans un environnement 3D qui se rapproche davantage de la réalité que les analyses 2D.

L'optimisation de la technique de marquage multiple a nécessité la mise à l'essai de plusieurs méthodes de fixation et de perméabilisation. Nous fiant à la précision et la finesse des images de chaque réseau du cytosquelette et de la hauteur cellulaire, laquelle témoigne d'une intégrité générale, nous avons identifié une méthode optimale de préservation structurelle qui permet aussi un marquage multiple en immunocytochimie. La méthode consiste à fixer et perméabiliser simultanément des cellules en utilisant un mélange de faible concentration des fixateurs paraformaldéhyde et glutaraldéhyde ainsi que de détergent Triton X-100. Le quadruple marquage des cellules fixées est ensuite devenu possible grâce à l'utilisation d'une combinaison d'anticorps spécifiques et d'agents intercalants, laquelle nous a été inspirée par une étude précédente sur des chondrocytes (Blanc, Tran-Khanh, Filion and Buschmann 2005). Nous avons cependant dû modifier la méthode pour l'adapter à un type de cellule et à un milieu de culture différent. Puisque les trois réseaux (vimentine, actine et tubuline) présents dans les CSM

adoptent une distribution complexe, irradiant dans toutes les directions, contrairement aux réseaux plus diffus des chondrocytes en agarose, l'optimisation finale devait être très minutieuse.

Cette méthode de marquage a été appliquée par la suite à des cellules en migration dans un essai transmembranaire. La fixation rapide des cellules à différents moments de la migration a permis l'observation chronologique de l'organisation et de la distribution des éléments du cytosquelette. Cela a permis de relever des similarités et des différences avec les modèles 2D existants. Parmi les similarités, citons la réponse initiale des cellules par une polarisation morphologique, l'extension de protrusions membranaires dans la direction du gradient, la formation et la maturation d'adhésions à l'avant de la cellule et la proximité des fibres d'actine et de tubulines, ce qui laisse croire qu'il y a interaction fonctionnelle entre ces deux éléments. Par contre, la présence de microtubules à l'extrémité distale des extensions au niveau des pointes d'actine dans des structures appelées filipodes, n'est pas un phénomène que l'on retrouve dans les modèles 2D. D'autres différences incluent la forme toroïdale des extensions membranaires et, dans certaines cellules, la localisation du noyau à l'extrémité apicale de la cellule migrant dans l'axe z. La première peut être due à la topographie du substrat à travers lequel migrent les cellules et la seconde à une restriction physique des pores sur un noyau possédant une capacité limitée de se déformer. La translocation nucléaire est un phénomène peu étudié, faute de techniques; nos images suggèrent une translocation dynamique sous l'influence des microtubules et de l'actine.

La faible distance sur laquelle migrent les cellules ($\sim 10\ \mu\text{m}$) dans notre système semble rendre celui-ci plus limité que l'utilisation de matrices polymériques. De plus cela représente une distinction par rapport à la situation *in vivo*. Il a été démontré dans des matrices polymériques 3D que le mouvement cellulaire s'effectue par plusieurs cycles de migration à travers une série de pores et d'ouvertures (Friedl, Zanker et al. 1998), alors que dans notre système un seul cycle suffit pour traverser la membrane. En fait, cela constitue un avantage. Contrairement aux études 3D avec les gels polymériques, où la direction de migration est difficile à prévoir et le foyer difficile à atteindre, notre système permet l'imagerie de ce cycle 3D à une résolution et à un niveau de détails supérieurs, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives qui viennent compléter le modèle intégré de la migration sur une plus longue distance à travers une série de pores. En somme, la technique et les images présentées dans ce manuscrit pourraient s'avérer des outils potentiellement puissants pour l'étude de la migration cellulaire.

Cette technique pourrait servir de complément 3D aux systèmes 2D actuellement utilisés pour étudier des processus comme le développement, la maturation et la distribution des complexes d'adhésion, la réorientation des centrosomes à la polarisation, le transfert et la déformation nucléaire, la distribution des moteurs acto-myosin et des protéines d'assemblage des MT au niveau des protrusions. Nous croyons également que cette technique pourrait être utilisée pour l'imagerie de cellules vivantes. Dans le contexte de la médecine régénérative, où la compréhension des mécanismes des

migrations de cellules comme les CSM est importante pour le développement rationnel de plates formes cellulaires, cette technique serait utile pour analyser des mécanismes qui sous-tendent les résultats de la prochaine étude.

L'objectif principal de la troisième étude était d'évaluer le potentiel de chimiotactisme et d'haptotaxisme des composantes de la MEC impliquées dans la réparation de lésions sur les CSM, tout en comparant les cellules d'humain et de lapin, un modèle animal commun en guérison des lésions orthopédiques. Pour se faire, nous avons utilisé l'essai transmembranaire, le même qui nous a permis d'imager les cellules mentionnées ci-haut, standardisé et optimisé cette fois pour l'étude quantitative de l'effet motogénique des molécules sur une population cellulaire. L'optimisation de la technique a abouti à une amélioration importante de sa résolution et de sa précision. Ce test optimisé a ensuite été utilisé pour : 1) tester les cellules de lapin et d'humain sur des facteurs comme TGF β , PDGF et FGF, des facteurs largement expérimentés sur les cellules humaines, de souris et de rats avec des résultats parfois contradictoires et variant selon l'espèce, 2) démontrer pour la première fois une stimulation de la migration dirigée des CSM par Fn, Vn et Coll et finalement 3) démontrer un comportement en migration similaire pour les CSM des deux espèces.

Les paramètres examinés lors de l'optimisation étaient l'utilisation d'albumine de sérum (BSA) dans les tampons des cellules et des agents chimioattractants, la période d'attachement au substrat avant la migration, le revêtement de la membrane avec des protéines ainsi que l'inanition des cellules. La technique finale, qui nous a permis

d'obtenir une migration optimale, consiste à utiliser des cellules cultivées pendant 24hrs dans un milieu pauvre en sérum (inanimation), avec des tampons sans BSA et sans période d'adhésion pré-migratoire en fixant avec le glutaraldehyde. Le revêtement de la membrane par les protéines Fn, Vn et Coll induit quant à lui une augmentation de la migration aléatoire, non-dirigée, et abaisse donc la sensibilité de l'essai et sa capacité d'identifier des agents chimioattractants. Le revêtement avec le BSA et l'acide hyaluronique inhibe complètement la migration. Il est donc conseillé de ne pas utiliser de revêtement protéique pour les tests de chimiotactisme avec les CSM.

La méthode optimisée permet d'obtenir des réponses au PDGF grandement supérieur, de l'ordre de dix, aux études similaires. Elle permet aussi d'affirmer avec conviction que les facteurs TGF β et FGF, stimulants pour les cellules de souris et de rats, ne le sont pas pour les cellules humaines et celles du lapin, et que ces dernières adoptent un comportement mobile similaire face à ces cytokines. Ce comportement similaire est aussi observé avec la prochaine classe d'agents testés, les protéines de la matrice extracellulaire Fn, Vn et Coll. Nos résultats démontrent que ces protéines ont la capacité d'induire une migration dirigée par chimiotactisme et par haptotaxisme.

L'impact de ces résultats se répercute principalement à deux niveaux. Premièrement, ils indiquent que les protéines de la MEC solubles pourraient être impliquées dans le contrôle de la distribution et du recrutement des cellules dans l'organisme suite à une blessure. L'augmentation des concentrations de ces protéines aux sites de lésions et leur capacité d'attirer d'autres types cellulaires confortent cette

hypothèse. De plus, même si la présence en circulation des CSM reste débattue, plusieurs études récentes suggèrent un rôle important des CSM aux sites de lésions distants de la moelle. Deuxièmement, la capacité des protéines solubles d'induire une migration dirigée suggère que le revêtement des biomatériaux de génie tissulaire avec des motifs en gradient de ces protéines puisse servir d'outil afin de provoquer une distribution optimale de ces cellules. Les applications varient selon le type d'implant.

Pour les implants avec cellules, on cherche souvent des solutions pour permettre aux cellules de quitter l'implant. Un gradient du centre de l'implant vers la périphérie permettrait aux cellules encastrées dans la plate-forme de se diriger vers les tissus lésés et contribuer à la régénération. Dans ce cas, les signaux locaux contribueraient à influencer la différenciation et les fonctions régénératrices des CSM. Inversement, un gradient de la périphérie vers le centre de l'implant permettrait d'améliorer l'intégration des implants aux tissus endommagés, une restriction courante dans ce genre de stratégie. Pour le développement de stratégies de recrutement, on peut aussi mentionner que l'identification de ces facteurs chimiotactiques pourrait servir au design de système de livraison contrôlée afin de guider les CSM vers le site de la lésion et en augmenter leur nombre. De plus, l'identification de nouvelles molécules chimioattractives pourrait aussi être grandement facilitée par l'optimisation de la méthode effectuée dans cette étude et décrite en détails dans l'article. En somme, cette dernière étude identifie des agents et des concentrations optimales pour le développement de plate-forme bio-instructive permettant possiblement d'implémenter les CSM dans diverses stratégies de

régénération.

Dans cette étude, les mécanismes responsables de la migration dirigée induite par les protéines de la MEC n'ont pas été étudiés. La prochaine étude projetée propose une technique combinant les méthodes des deux derniers articles afin d'analyser en détails les mécanismes impliqués lors des deux types de migration. Je pose l'hypothèse que l'observation microscopique en 3D de cellules marquées en fluorescence migrant sur des gradients insolubles de protéines permettrait d'acquérir des données novatrices et pertinentes complémentaires aux études *in vivo* dans le domaine du génie tissulaire. Par exemple, on pourrait procéder à l'analyse de la formation des adhésions sur les différentes composantes de la matrice liées au substrat, par le marquage de protéines de ces complexes adhésifs (paxilline, FAK, vinculine, intégrines) plutôt que par celui de la vimentine et/ou du noyau. Ceci permettrait d'observer les interactions de l'actine et des microtubules avec les protéines des complexes adhésifs afin de comprendre leurs maturations dans un environnement 3D.

Il est suggéré que les cellules utilisent selon le mode de migration, des récepteurs différents qui se lient à divers domaines des protéines de la matrice. L'utilisation d'anticorps spécifiques à certaines intégrines et de peptides synthétiques biomimétiques comme le RGD permettrait d'identifier les acteurs responsables de chaque type de migration. Ici aussi, les variations induites sur la migration par l'écrantage de récepteurs ou de domaines protéiques pourraient être observées en détails grâce à la méthode du chapitre six. Cette étude fournirait des renseignements originaux et pertinents sur les

interactions cellules-protéines lors de la migration des MSC en trois dimensions et permettrait de vérifier quel type de revêtement est le plus favorable, permettant une élaboration rationnelle de biomatériaux biofonctionnels dans le contexte de médecine régénérative.

RÉFÉRENCES

- Affolter, M. and C. J. Weijer (2005). "Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis." Dev Cell **9**(1): 19-34.
- Akizuki, S., V. C. Mow, et al. (1986). "Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus." J Orthop Res **4**(4): 379-92.
- Albelda, S. M. and C. A. Buck (1990). "Integrins and other cell adhesion molecules." Faseb J **4**(11): 2868-80.
- Alsberg, E., H. A. von Recum, et al. (2006). "Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications." Expert Opin Biol Ther **6**(9): 847-66.
- Angele, P., J. U. Yoo, et al. (2003). "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro." J Orthop Res **21**(3): 451-7.
- Bank, R. A., M. Krikken, et al. (1997). "A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage." Matrix Biol **16**(5): 233-43.
- Baschong, W., M. Duerrenberger, et al. (1999). "Three-dimensional visualization of cytoskeleton by confocal laser scanning microscopy." Methods Enzymol **307**: 173-89.
- Basser, P. J., R. Schneiderman, et al. (1998). "Mechanical properties of the collagen network in human articular cartilage as measured by osmotic stress technique." Arch Biochem Biophys **351**(2): 207-19.

- Billinghamurst, R. C., L. Dahlberg, et al. (1997). "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage." J Clin Invest **99**(7): 1534-45.
- Blanc, A., N. Tran-Khanh, et al. (2005). "Optimal Processing Method to Obtain Four-color Confocal Fluorescent Images of the Cytoskeleton and Nucleus in Three-dimensional Chondrocyte Cultures." J Histochem Cytochem.
- Bonassar, L. J., E. H. Frank, et al. (1995). "Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation." Arthritis Rheum **38**(2): 173-83.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.
- Brandt, K. D., S. L. Myers, et al. (1991). "Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament." Arthritis Rheum **34**(12): 1560-70.
- Brewton, R. G. and R. Mayne (1993). Extracellular matrix of cartilage: Collagen. Joint cartilage degradation. J. F. Woessner and D. S. Howell. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Bruckner, P. and M. van der Rest (1994). "Structure and function of cartilage collagens." Microsc Res Tech **28**(5): 378-84.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage repair and transplantation." Arthritis Rheum **41**(8): 1331-42.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998a). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions." Instr Course Lect **47**: 477-86.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1998b). "Articular cartilage: degeneration and

osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation." Instr Course Lect **47**: 487-504.

Buschmann, M. D., Y. A. Gluzband, et al. (1995). "Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture." J Cell Sci **108 (Pt 4)**: 1497-508.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.

Caplan, A. I. (2005). "Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics." Tissue Eng **11**(7-8): 1198-211.

Chevrier, A., C. D. Hoemann, et al. (2006). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects." Osteoarthritis Cartilage.

Cho, J. H., S. H. Kim, et al. (2004). "Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer." Biomaterials **25**(26): 5743-51.

Choong, M. L., A. C. Tan, et al. (2003). "A novel role for proliferin-2 in the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells." FEBS Lett **550**(1-3): 155-62.

Clark, R. A. (1988). "Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair." Arch Dermatol **124**(2): 201-6.

Clark, R. A. (1993). "Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair." Am J Med Sci **306**(1): 42-8.

Clark, R. A. (1996). Wound Repair: Overview and General Considerations. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York, Plenum Press: 3-35.

- Clark, R. A. (2001). "Fibrin and wound healing." Ann N Y Acad Sci **936**: 355-67.
- Conrad, P. A., K. A. Giuliano, et al. (1993). "Relative distribution of actin, myosin I, and myosin II during the wound healing response of fibroblasts." J Cell Biol **120**(6): 1381-91.
- Cremer, M. A., E. F. Rosloniec, et al. (1998). "The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease." J Mol Med **76**(3-4): 275-88.
- Cukierman, E., R. Pankov, et al. (2001). "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension." Science **294**(5547): 1708-12.
- Dang, J. M., D. D. Sun, et al. (2006). "Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells." Biomaterials **27**(3): 406-18.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-42.
- DeMali, K. A., K. Wennerberg, et al. (2003). "Integrin signaling to the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 572-82.
- Dertinger, S. K., X. Jiang, et al. (2002). "Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12542-7.
- Deuel, T. F., R. M. Senior, et al. (1982). "Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor." J Clin Invest **69**(4): 1046-9.
- Devreotes, P. N. and S. H. Zigmond (1988). "Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium." Annu Rev Cell Biol **4**: 649-86.
- Diekmann, D., A. Abo, et al. (1994). "Interaction of Rac with p67phox and regulation of

- phagocytic NADPH oxidase activity." Science **265**(5171): 531-3.
- Dike, L. E., C. S. Chen, et al. (1999). "Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(8): 441-8.
- DiMilla, P. A., J. A. Stone, et al. (1993). "Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength." J Cell Biol **122**(3): 729-37.
- Divecha, N. and R. F. Irvine (1995). "Phospholipid signaling." Cell **80**(2): 269-78.
- Dumont, J., M. Ionescu, et al. (1999). "Mature full-thickness articular cartilage explants attached to bone are physiologically stable over long-term culture in serum-free media." Connect Tissue Res **40**(4): 259-72.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 67-72.
- Eyre, D. R. and J. J. Wu (1995). "Collagen structure and cartilage matrix integrity." J Rheumatol Suppl **43**: 82-5.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle, et al. (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue." Biochim Biophys Acta **883**(2): 173-7.
- Farndale, R. W., C. A. Sayers, et al. (1982). "A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures." Connect Tissue Res **9**(4): 247-8.
- Farquhar, T., Y. Xia, et al. (1996). "Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact." J Orthop Res **14**(3): 417-23.

- Firtel, R. A. and C. Y. Chung (2000). "The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients." Bioessays **22**(7): 603-15.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, et al. (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." Exp Hematol **2**(2): 83-92.
- Friedl, P., K. S. Zanker, et al. (1998). "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function." Microsc Res Tech **43**(5): 369-78.
- Friedman, M. J., C. C. Berasi, et al. (1984). "Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee." Clin Orthop Relat Res(182): 200-5.
- Furukawa, T., D. R. Eyre, et al. (1980). "Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee." J Bone Joint Surg Am **62**(1): 79-89.
- Gonzalez-Amaro, R. and F. Sanchez-Madrid (1999). "Cell adhesion molecules: selectins and integrins." Crit Rev Immunol **19**(5-6): 389-429.
- Grinnell, F. (1984). "Fibronectin and wound healing." J Cell Biochem **26**(2): 107-16.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol **189**(1): 54-63.
- Hall, A. (1994). "A biochemical function for ras--at last." Science **264**(5164): 1413-4.
- Hammarback, J. A., J. B. McCarthy, et al. (1988). "Growth cone guidance by substrate-

bound laminin pathways is correlated with neuron-to-pathway adhesivity." Dev Biol **126**(1): 29-39.

Helfand, B. T., L. Chang, et al. (2004). "Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture." J Cell Sci **117**(Pt 2): 133-41.

Hodge, W. A., R. S. Fijan, et al. (1986). "Contact pressures in the human hip joint measured in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2879-83.

Hoemann, C. D., M. Hurtig, et al. (2005). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects." J Bone Joint Surg Am **87**(12): 2671-86.

Hollander, A. P., T. F. Heathfield, et al. (1994). "Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay." J Clin Invest **93**(4): 1722-32.

Horwitz, A. R. and J. T. Parsons (1999). "Cell migration--movin' on." Science **286**(5442): 1102-3.

Horwitz, R. and D. Webb (2003). "Cell migration." Curr Biol **13**(19): R756-9.

Huang, C. Y., P. M. Reuben, et al. (2004). "Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **278**(1): 428-36.

Huang, Q., J. C. Goh, et al. (2002). "In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis." Tissue Eng **8**(3): 469-82.

Hulth, A., L. Lindberg, et al. (1970). "Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report." Acta Orthop Scand **41**(5): 522-30.

- Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 432-63.
- Javazon, E. H., K. J. Beggs, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging." Exp Hematol **32**(5): 414-25.
- Jeffrey, J. E., D. W. Gregory, et al. (1995). "Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage." Arch Biochem Biophys **322**(1): 87-96.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." Exp Cell Res **238**(1): 265-72.
- Kempson, G. E., H. Muir, et al. (1973). "The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans." Biochim Biophys Acta **297**(2): 456-72.
- Khosla, S. and G. Z. Eghbali-Fatourehchi (2006). "Circulating cells with osteogenic potential." Ann N Y Acad Sci **1068**: 489-97.
- Kim, D. H., K. H. Yoo, et al. (2005). "Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell." Cytokine **31**(2): 119-26.
- Kiviranta, I., J. Jurvelin, et al. (1987). "Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs." Arthritis Rheum **30**(7): 801-9.

- Kohler, N. and A. Lipton (1974). "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity." Exp Cell Res **87**(2): 297-301.
- Korhonen, R. K., M. S. Laasanen, et al. (2003). "Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage." J Biomech **36**(9): 1373-9.
- Kozaci, L. D., D. J. Buttle, et al. (1997). "Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures." Arthritis Rheum **40**(1): 164-74.
- Kraus, V. B. (1997). "Pathogenesis and treatment of osteoarthritis." Med Clin North Am **81**(1): 85-112.
- Kresse, H. (1992). Structural components of cartilage Articular cartilage and osteoarthritis. K. E. Kuettner, R. Schleyerbarch, R. Peyron and V. C. Hascall. New York, Raven Press.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-40.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Le Blanc, K. and M. Pittenger (2005). "Mesenchymal stem cells: progress toward promise." Cytotherapy **7**(1): 36-45.
- Lippiello, L., D. Hall, et al. (1977). "Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage." J Clin Invest **59**(4): 593-600.
- Lisenmayer, T. F. (1991). Collagen. Cell biology of extracellular matrix. H. E.D. New York, Plenum Press.

- Mankin, H. J. (1974). "The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts)." N Engl J Med **291**(25): 1335-40.
- Maroudas, A. and R. Schneiderman (1987). "'Free' and 'exchangeable' or 'trapped' and 'non-exchangeable' water in cartilage." J Orthop Res **5**(1): 133-8.
- Matrisian, L. M. (1990). "Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling." Trends Genet **6**(4): 121-5.
- Matthews, B. D., D. R. Overby, et al. (2006). "Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels." J Cell Sci **119**(Pt 3): 508-18.
- McCarthy, J. B., Iida, J., Furcht, LT (1996). Mechanisms of Parenchymal Cell Migration Into Wounds. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. R. A. Clark. New York, Plenum Press: 373-386.
- McLaughlin, S. H. and N. J. Bulleid (1998). "Molecular recognition in procollagen chain assembly." Matrix Biol **16**(7): 369-77.
- Mow, V. C., M. H. Holmes, et al. (1984). "Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review." J Biomech **17**(5): 377-94.
- Muir, H., P. Bullough, et al. (1970). "The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications." J Bone Joint Surg Br **52**(3): 554-63.
- Nelson, R. D., P. G. Quie, et al. (1975). "Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes." J Immunol **115**(6): 1650-6.
- Newman, A. P. (1998). "Articular cartilage repair." Am J Sports Med **26**(2): 309-24.

- Norman, J. C., L. S. Price, et al. (1994). "Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins." J Cell Biol **126**(4): 1005-15.
- O'Driscoll, S. W., F. W. Keeley, et al. (1988). "Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year." J Bone Joint Surg Am **70**(4): 595-606.
- Olsen, B. R. (1991). The active gene of cartilage Cartilage: molecular aspects. B. K. Hall and S. Newman. Boca Raton, CRC Press.
- Olsen, B. R. (1991). Collagen biosynthesis. Cell biology of extracellular matrix E. D. Hay. New York, Plenum Press.
- Opalenik, S. R. and J. M. Davidson (2005). "Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair." Faseb J **19**(11): 1561-3.
- Parent, C. A. and P. N. Devreotes (1999). "A cell's sense of direction." Science **284**(5415): 765-70.
- Pierce, G. F., J. E. Tarpley, et al. (1994). "Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB." Am J Pathol **145**(6): 1399-410.
- Pierce, G. F., J. E. Tarpley, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair." Am J Pathol **140**(6): 1375-88.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.

- Poole, A. R., I. Pidoux, et al. (1982). "An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage." J Cell Biol **93**(3): 921-37.
- Poole, A. R., G. Rizkalla, et al. (1993). "Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization." Agents Actions Suppl **39**: 3-13.
- Poole, C. A., M. H. Flint, et al. (1984). "Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices." J Anat **138** (Pt 1): 113-38.
- Postlethwaite, A. E. and A. H. Kang (1976). "Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes." J Exp Med **143**(6): 1299-307.
- Postlethwaite, A. E., J. M. Seyer, et al. (1978). "Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(2): 871-5.
- Pridie, K. H. and V. E. Mc (1958). "An apparatus for use in nailing of the femoral neck." J Bone Joint Surg Br **40-B**(4): 740-1.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.
- Prockop, D. J., A. L. Sieron, et al. (1998). "Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling." Matrix Biol **16**(7): 399-408.
- Pun, Y. L., R. W. Moskowitz, et al. (1994). "Clinical correlations of osteoarthritis associated with a single-base mutation (arginine519 to cysteine) in type II procollagen gene. A newly defined pathogenesis." Arthritis Rheum **37**(2): 264-9.

- Radin, E. L. and I. L. Paul (1971). "Response of joints to impact loading. I. In vitro wear." Arthritis Rheum **14**(3): 356-62.
- Ramoshebi, L. N., T. N. Matsaba, et al. (2002). "Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration." Expert Rev Mol Med **2002**: 1-11.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1994). "Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase." Embo J **13**(11): 2600-10.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.
- Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya, et al. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." Stem Cells **21**(1): 105-10.
- Rosenberg, L. C. and J. A. Bulkwalter (1986). Cartilage proteoglycans. Articular cartilage biochemistry. K. E. Kuettner, R. Schleyerbarch and V. C. Hascall. New York, Raven Press.
- Ross, R., J. Glomset, et al. (1974). "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1207-10.

- Ross, R. and A. Vogel (1978). "The platelet-derived growth factor." Cell **14**(2): 203-10.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." Science **238**(4826): 491-7.
- Sah, R. L., J. Y. Doong, et al. (1991). "Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants." Arch Biochem Biophys **286**(1): 20-9.
- Sasahara, M., Y. Hayase, et al. (1995). "Platelet-derived growth factor B-chain comprises the major part of enhanced released mitogen from aortic endothelial cells of stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **22**(1): S123-5.
- Sekiya, I., J. T. Vuoristo, et al. (2002). "In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4397-402.
- Setton, L. A., V. C. Mow, et al. (1997). "Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization." Osteoarthritis Cartilage **5**(1): 1-16.
- Shapiro, F., S. Koide, et al. (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **75**(4): 532-53.
- Shingleton, W. D., D. J. Hodges, et al. (1996). "Collagenase: a key enzyme in collagen turnover." Biochem Cell Biol **74**(6): 759-75.
- Silva, E. A. and D. J. Mooney (2004). "Synthetic extracellular matrices for tissue

- engineering and regeneration." Curr Top Dev Biol **64**: 181-205.
- Simpson, D. M. and R. Ross (1972). "The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum." J Clin Invest **51**(8): 2009-23.
- Small, J. V., I. Kaverina, et al. (1999). "Cytoskeleton cross-talk during cell motility." FEBS Lett **452**(1-2): 96-9.
- Solchaga, L. A., J. E. Dennis, et al. (1999). "Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage." J Orthop Res **17**(2): 205-13.
- Soulhat, J., M. D. Buschmann, et al. (1999). "A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression." J Biomech Eng **121**(3): 340-7.
- Souza, P., L. Sedlackova, et al. (1994). "Antisense oligodeoxynucleotides targeting PDGF-B mRNA inhibit cell proliferation during embryonic rat lung development." Development **120**(8): 2163-73.
- Stossel, T. P. (1989). "From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly." J Biol Chem **264**(31): 18261-4.
- Takahashi, I., G. H. Nuckolls, et al. (1998). "Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells." J Cell Sci **111 (Pt 14)**: 2067-76.
- Tang, L. H., J. A. Buckwalter, et al. (1996). "Effect of link protein concentration on articular cartilage proteoglycan aggregation." J Orthop Res **14**(2): 334-9.
- Taylor, K. B. and G. M. Jeffree (1969). "A new basic metachromatic dye, I:9-dimethyl methylene blue." Histochem J **1**(3): 199-204.

- Thiery, J. P. (1984). "Mechanisms of cell migration in the vertebrate embryo." Cell Differ **15**(1): 1-15.
- Thompson, R. C., Jr., T. R. Oegema, Jr., et al. (1991). "Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model." J Bone Joint Surg Am **73**(7): 990-1001.
- Tranquillo, R. T., S. H. Zigmond, et al. (1988). "Measurement of the chemotaxis coefficient for human neutrophils in the under-agarose migration assay." Cell Motil Cytoskeleton **11**(1): 1-15.
- Tsuchida, H., J. Hashimoto, et al. (2003). "Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats." J Orthop Res **21**(1): 44-53.
- Van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." Faseb J **5**(13): 2814-23.
- Van Haastert, P. J. and P. N. Devreotes (2004). "Chemotaxis: signalling the way forward." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 626-34.
- Vicente-Manzanares, M., D. J. Webb, et al. (2005). "Cell migration at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 21): 4917-9.
- Villemure, I., M. A. Chung, et al. (2002). "The effects of mechanical loading on the mRNA expression of growth-plate cells." Stud Health Technol Inform **91**: 114-8.
- Villemure, I., M. A. Chung, et al. (2005). "Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth." Connect Tissue Res **46**(4-5): 211-9.
- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1994). "Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **76**(4): 579-92.

- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1998). "Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel." Tissue Eng **4**(4): 429-44.
- Wang, W. G., S. Q. Lou, et al. (2003). "In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGF-beta2." Tissue Cell **35**(1): 69-77.
- Waterman-Storer, C. M. and E. Salmon (1999). "Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 61-7.
- Webb, D. J., C. M. Brown, et al. (2003). "Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 614-20.
- Wei, X., J. Gao, et al. (1997). "Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint." J Biomed Mater Res **34**(1): 63-72.
- Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**(3): 835-70.
- Williams, C. G., T. K. Kim, et al. (2003). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel." Tissue Eng **9**(4): 679-88.
- Woo, S. L., P. Lubock, et al. (1979). "Large deformation nonhomogeneous and directional properties of articular cartilage in uniaxial tension." J Biomech **12**(6): 437-46.
- Wu, D. D., D. B. Burr, et al. (1990). "Bone and cartilage changes following experimental varus or valgus tibial angulation." J Orthop Res **8**(4): 572-85.

- Yu, T. T. and M. S. Shoichet (2005). "Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering." Biomaterials **26**(13): 1507-14.
- Zicha, D., G. A. Dunn, et al. (1991). "A new direct-viewing chemotaxis chamber." J Cell Sci **99 (Pt 4)**: 769-75.
- Zigmond, S. H. (1977). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 606-16.
- Zigmond, S. H. and J. G. Hirsch (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor." J Exp Med **137**(2): 387-410.